

**Ein Beitrag zur Primärstruktur des
Humanhämoglobins A:
Sequenzanalysen an tryptischen Peptiden**

Renate Müller

1961



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555212_0025

Ein Beitrag zur Primärstruktur des Humanhämoglobins A:

Sequenzanalysen an tryptischen Peptiden

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Renate Müller

aus

Simmersfeld/Schwarzwald

1961



1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Butenandt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bamann

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Mai 1961

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1958 bis November 1960 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. A. Butenandt im Max-Planck-Institut für Biochemie ausgeführt.

Herrn Professor Butenandt bin ich zu grossem Dank verpflichtet für die angenehmen Bedingungen in seinem Institut und für die wohlwollende Förderung meiner Arbeit.

Herrn Dr. G. Braunitzer danke ich sehr für seine ständige Hilfsbereitschaft und für die vielen wertvollen Ratschläge.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Verwendete Abkürzungen	III
Einleitung	1
<u>Allgemeiner Teil</u>	
A. <u>Gewinnung der tryptischen Peptide</u>	3
B. <u>Sequenzanalyse der tryptischen Peptide</u>	5
I. Peptide der α -Kette	
HT α 5: Beispiel für stufenweisen EDMAN-Abbau in Lösung	5
HT α 3: Beispiel für stufenweisen EDMAN-Abbau auf dem Papier	8
HT α 6: Beispiel für überlappende, fermentative Spaltungen	9
HT α 12:	12
II. Peptide der β -Kette	
HT β 5:	14
HT β 4: Aufklärung eines Peptides mit einer 3fachen Valylsequenz	17
HT β 7: Aufklärung eines Peptides mit einer Prolyl- Doppelsequenz	20
C. <u>Diskussion der Sequenzanalyse</u>	24
Die Erweiterung der Methodik	
D. <u>Der homologe Bau der Polypeptidketten</u>	27
E. <u>Vervielfachung von Sequenzen</u>	29
Die mögliche Bedeutung der Prolyl-Doppelsequenz für die Tertiärstruktur des Hämoglobinmoleküls	30

Experimenteller Teil

A. <u>Allgemeine Methoden</u>	31
B. <u>Durchführung der Analysen an den Peptiden</u>	34
Peptide der α -Kette	
HT α 5:	34
HT α 3:	35
HT α 6:	36
HT α 12:	38
Peptide der β -Kette	
HT β 5	40
HT β 4	42
HT β 7	45
Zusammenfassung	49
Literaturverzeichnis	50

Verwendete Abkürzungen

Zur Charakterisierung der tryptischen Peptide aus Humanglobin A verwenden wir folgende Bezeichnungen:

H: Human

T: Tryptisch

α : das Peptid stammt aus der α -Kette

β : " " " " " β -Kette

z.B. bedeutet HT α 5: Tryptisches Peptid aus der α -Kette des Humanglobins, das bei der Elution über Dowex 1-X2 als Peptid Nr. 5 eluiert wird. (s.S. 3)

Für die Aminosäuren werden die in der Arbeit von BRAND und EDSALL¹⁾ (1947) angegebenen Abkürzungen verwendet.

MSH : Melanophoren-stimulierendes-Hormon

FDNB : 2,4-Dinitro-1-Fluorbenzol

DNP- : 2,4-Dinitrophenyl-Rest

DNPOH: 2,4-Dinitrophenol

PTC- : Phenyl-thiocarbamyl-Rest

PTH- : Phenyl-thiohydantoin-Rest

BEW : n-Butanol/Eisessig/Wasser. Wenn nicht besonders angegeben, im Verhältnis 4:1:5 = "PARTRIDGE"-System

R_{Leu} : R_f-Wert in BEW bezogen auf Leucin = 1.0

R_{Lys} : R_f-Wert in der Hochspannungselektrophorese, bezogen auf Lysin = 1.0

R_{Asp} : R_f-Wert in der Hochspannungselektrophorese, bezogen auf Asparaginsäure = 1.0

1-d-Chromatographie: 1-dimensionale Papierchromatographie

2-d-Chromatographie: 2- " "

Einleitung

Die Hämoglobine, die wegen ihrer Funktion als Sauerstoffüberträger zu den wichtigsten Proteinen der Wirbeltiere gehören, lassen sich leicht kristallin gewinnen.

Da die Farbkomponente, das Häm, in allen Hämoglobinen dasselbe ist, liegt die Spezifität der Hämoglobine im Proteinanteil begründet.

Die Erforschung der Eiweisskomponenten erschien zunächst als ein unlösbares Problem. Erst als SVEDBERG ²⁾ 1926 aus der Sedimentationskonstanten in der Ultrazentrifuge das Molgewicht des Pferdehämoglobins zu 68 000 berechnen konnte, war gezeigt, dass Hämoglobine aus diskreten Partikeln bestehen.

Ein Einblick in die chemische Feinstruktur von Proteinen war jedoch erst 17 Jahre später möglich, nachdem SANGER ³⁾ mit der von ihm entwickelten DNP-Methode die Art und die Zahl der N-terminalen Aminosäuren im Insulin bestimmen konnte. Mit dieser Methodik fanden RHINESMITH, SCHROEDER und PAULING ⁴⁾ (1957) 4 Valyl-Endgruppen pro Mol Humanhämoglobin. Demnach baut sich das Protein aus 4 Polypeptidketten auf. Die Frage, ob zwischen diesen 4 Ketten mit identischen Endgruppen strukturelle Ähnlichkeiten bestehen, wurde kurz danach gelöst, als es denselben Autoren ⁵⁾ gelang, das DNP-Partialpeptid DNP-Val-Leu in einer Ausbeute von 50 Mol% zu isolieren und BRAUNITZER ⁶⁾ (1958) die beiden restlichen Endgruppen dem DNP-Tripeptid DNP-Val-His-Leu zuordnete. Aus diesen Ergebnissen entwickelte sich die Anschauung, dass jeweils 2 der 4 Ketten identisch sind und dem Gesamtglobin die Formel $\alpha\alpha/\beta\beta$ zukommt.

Dies wurde auf physikalischem und auf chemischem Wege bewiesen:

PERUTZ ⁷⁾ gelang es vor kurzem, durch Markierung des Pferdehämoglobins mit Schwermetallen isomorphe Kristalle herzustellen und sie mit Röntgenstrahlen zu analysieren. Dies führte zu einem Modell, in dem die 4 Polypeptidketten des undissoziierten Moleküls ungefähr tetraedrisch angeordnet sind. Alle 4 Ketten sind in ihrem räumlichen Bau ähnlich, jeweils 2 sind völlig identisch. Bereits 1958 war es KENDREW ⁸⁾ gelungen, ein 3-dimensionales Modell des Myoglobins zu entwerfen. Myoglobin enthält nur eine Polypeptidkette und ist als extrazelluläres Globin phylogenetisch nicht mit den Hämoglobinen

höherer Tiere verwandt. Trotzdem zeigt sich eine erstaunliche Übereinstimmung in der Tertiärstruktur dieser beiden Globine. Dies lässt einen homologen Bau bei allen Hämoglobinen vermuten, der nur auf einer ähnlichen Primärstruktur, d.h. auf homologen Aminosäuresequenzen beruhen kann.

Dass von den im Haemoglobin vorliegenden 4 Peptidketten jeweils 2 identisch sind, wird durch die Untersuchungen der Primärstruktur bewiesen. Die Trennung der Peptidketten des Pferdeglobins gelang WILSON und SMITH⁹⁾ durch Säulenchromatographie unter Anwendung eines steigenden Harnstoffgradienten. Die Methode wurde von HILSE und BRAUNITZER¹⁰⁾ auf das Humanglobin übertragen. Das von CRAIG¹¹⁾ entwickelte Verteilungsverfahren ermöglicht eine noch vollständigere Trennung der beiden Ketten in präparativem Masstab. Beide Ketten können nun durch ihre tryptischen Spaltprodukte quantitativ charakterisiert werden, denn das von RUDLOFF und BRAUNITZER¹²⁾ entwickelte Verfahren zur säulenchromatographischen Trennung von Peptiden gestattet die Isolierung sämtlicher tryptischer Globinpeptide. Damit wurde die Aufstellung der exakten Summenformel des Humanhämoglobins A möglich.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Analyse solcher tryptischen Partialpeptide aus Humanglobin. Es konnte die Sequenz von 58 Aminosäuren ermittelt werden, das entspricht $\frac{1}{5}$ der in beiden Ketten enthaltenen Aminosäurereste. Durch die Kenntnis dieser Sequenzen wurde die Zuordnung der tryptischen Peptide innerhalb der beiden Ketten erleichtert, die BRAUNITZER, RUDLOFF und HILSCHMANN^{13,14)} durch wechselseitige tryptische und peptische Spaltungen der isolierten Ketten gelang.

Die Sequenzanalyse an den beiden Globinketten bestätigt die Vermutung vom homologen Bau der Ketten¹⁵⁾. Darüber hinaus haben Sequenzstudien allgemeine Bedeutung zur Erforschung der Proteinbiosynthese, in deren Ablauf im Falle des Hämoglobins BISHOP, LEAHY und SCHWEET¹⁶⁾ bereits einen ersten Einblick gewinnen konnten.

Allgemeiner Teil

A. Die Gewinnung der tryptischen Peptide

Zur chemischen Charakterisierung des Globins ist es notwendig, das Makromolekül in eine diskrete Anzahl definierbarer Bruchstücke zu zerlegen. Hierfür eignen sich vor allem die Proteasen mit hoher Substratspezifität. Da reines Trypsin ausschliesslich und quantitativ die Peptidbindung am Carboxylende der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet, wurde dieses Ferment zur Hydrolyse von Humanglobin herangezogen.

Mit dem von V. RUDLOFF und G. BRAUNITZER¹²⁾ entwickelten Trennverfahren über den Anionenaustauscher Dowex 1-X2 ist es möglich, sämtliche löslichen Peptide des Globins entsprechend ihrer Nettoladung zu trennen. Alle in dieser Arbeit behandelten Peptide wurden nach diesem Verfahren gewonnen.

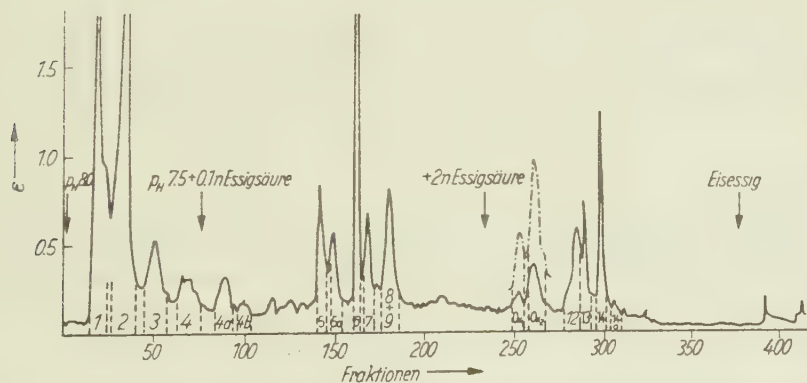


Abbildung 1

Elutionsdiagramm der über Dowex 1-X2
getrennten tryptischen Peptide

Die einzelnen Gipfel des Diagramms (Abb. 1) enthalten teilweise mehrere Komponenten. Dies gilt besonders für die beiden ersten Gipfel. Sie enthalten die basischen Peptide, die am Harz relativ schlecht getrennt werden. Zur Isolierung und Nachreinigung können 2 Methoden herangezogen werden:

1. Die Hochspannungselektrophorese

Die Art und die Zahl der Nettoladungen eines Peptids bestimmen dessen Wanderungsgeschwindigkeit und den R_f -Wert im elektrischen Feld. Die Elektrophorese wird als Trennverfahren der tryptischen Peptide vor allem dann verwendet, wenn es sich um die Reindarstellung von Peptiden handelt, die zwar gleichartig aber unterschiedlich stark geladen sind. Zum Beispiel können basische Peptide aus den Extinktionsgipfeln 1 und 2 nach dieser Methode voneinander getrennt werden.

2. Die Verteilungschromatographie am Papier

mit geeigneten Lösungsmittelsystemen. Hier hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der Art und der Anzahl der Aminosäuren ab. Basische Peptide werden von sauren Lösungsmitteln nur langsam eluiert, Peptide mit lipophilen, organischen Resten wandern in organischen Solventien schneller als solche mit kurzen, aliphatischen Seitenketten.

So wird man bei der Chromatographie von HT α 5 (Asp₁, Thr₁, Val₁, Lys₁) in dem organischen, sauer reagierenden PARTRIDGE-System einen ziemlich niedrigen R_{Leu} -Wert zu erwarten haben, da die lipophile Seitenkette des Valins zwar die Elution beschleunigt, die positive Ladung des Lysins und die hydrophile Asparaginsäure jedoch eine Verzögerung bewirken.

Zur Isolierung des Peptides HT α 3 (Gly₂, His₁, Lys₁) in reiner Form ist es allerdings nicht möglich, vom tryptischen Hydrolysat des Gesamtglobins auszugehen, da das homologe Peptid aus der β -Kette, HT β 2, auf Grund seiner ähnlichen Aminosäurezusammensetzung: (Ala₁, Gly₁, His₁, Lys₁) weder chromatographisch noch durch Elektrophorese von HT α 3 getrennt werden kann.

Inzwischen gelang jedoch die Trennung der beiden nativen α - und β -Polypeptidketten des Globins in präparativem Masstab¹¹⁾, so dass die tryptische Spaltung und die chromatographische Trennung der Spaltpeptide an jeder Kette gesondert durchgeführt werden konnten. Zwar erscheint das stark basische Peptid auch dann noch mit 3 anderen Komponenten zusammen im gleichen Gipfel, diese wandern jedoch im PARTRIDGE-System schneller und können so von HT α 3 getrennt werden.

Die Peptide, die im Säulenchromatogramm die einzigen Bestandteile eines Extinktionsgipfels sind, wie HT α 6, HT α 12 und HT β 7, sind noch mit den Elutionspuffern, besonders mit Pyridin-Acetat, verunreinigt. Sie können ebenfalls durch Papierchromatographie oder Hochspannungselektrophorese rein gewonnen werden.

B. Sequenzanalysen an tryptischen Peptiden

I. Peptide der α -Kette

HT α 5¹⁵⁾: ein Beispiel für stufenweisen EDMAN-Abbau in Lösung

1. Gewinnung: Das Peptid wird bei der Trennung des tryptischen Hydrolysats aus Gesamtglobin bereits im 2. Gipfel eluiert, es verhält sich also in der Austauschersäule wie ein basisches Peptid. Dies lässt bereits vermuten, dass die freie Carboxylgruppe der Asparaginsäure amidiert ist. Zur Isolierung von HT α 5 wird die Verteilungschromatographie am Papier herangezogen.

2. Summenformel: Asp₁, Thr₁, Val₁, Lys₁.

3. Konstitutionsermittlung: Da bei einer so kurzen Peptidkette mit Endopeptidasen keine Spaltung mehr erfolgt, wurde zur Sequenzanalyse der stufenweise EDMAN-Abbau in Lösung herangezogen. Bei dieser Methode wird die N-terminale Aminosäure als Phenylthiohydantoinderivat isoliert.

Der Abbau verläuft in 2 Schritten:

- a) Anlagerung des Reagenzes (Phenylsenföl) an die freie Aminogruppe zur Thioharnstoffverbindung
- b) Ringschluss zum Phenylthiohydantoinderivat unter gleichzeitiger Abspaltung aus dem Peptidverband.

Die Anwendungsmöglichkeiten des Verfahrens werden auf Seite 24 beschrieben.

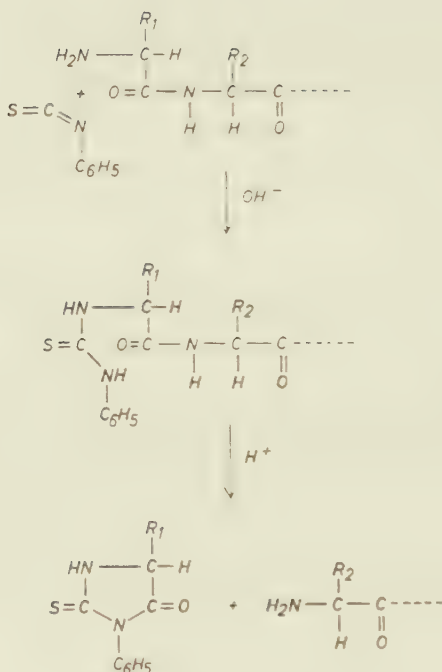


Abbildung 2

Schema des EDMAN-Abbaus

Das vorliegende Peptid HT α 5 wurde zur Thioharnstoffverbindung umgesetzt und anschliessend in chlorwasserstoffsättigtem Eisessig zyklisiert. Die gebildete PTH-Aminosäure konnte chromatographisch identifiziert und ein aliquoter Teil des Restpeptides quantitativ analysiert werden. Hierzu wurde dieser Anteil totalhydrolysiert und das Hydrolysat im Aminosäure-Analysator vermessen. Das Aminosäure-Gemisch wird dabei über eine Ionenaustauschersäule getrennt und das Eluat einer quantitativen Ninhydrinreaktion unterworfen. Die Farbintensität der einzelnen Komponenten wird von einer Photozelle gemessen und automatisch registriert. Da die Farbtiefe ein direktes Mass für die Menge der betreffenden Aminosäure darstellt, so lässt sich aus dem Kurveninhalt die quantitative Zusammensetzung des Peptides berechnen.

Auf das Tetrapeptid HT α 5 wurde der EDMAN'sche Abbau insgesamt dreimal angewandt.

Die Analysenergebnisse der jeweils vermessenen Resipeptide sind in Abbildung 3 zusammengestellt. Durch Vergleichen der Werte lässt sich die Sequenz dieses Peptides unmittelbar ablesen.

Auf die Bestimmung des Lysin-Wertes wurde jeweils verzichtet, da die Stellung dieser Aminosäure am Carboxylende des Peptides aus der Spezifität der tryptischen Spaltung folgt.

Der eindeutige chromatographische Nachweis der PTH-Aminosäuren gelang nur in den beiden ersten Stufen als

1.) PTH - Thr

und 2.) PTH - Asp-NH₂

a) Analyse des Ausgangspeptides:
(Thr, Asp, Val) - Lys

b) nach dem 1. Abbauschritt:
Thr - (Asp, Val) - Lys

c) nach dem 2. Abbauschritt:

d) nach dem 3. Abbauschritt:
Thr - Asp - Val - Lys.

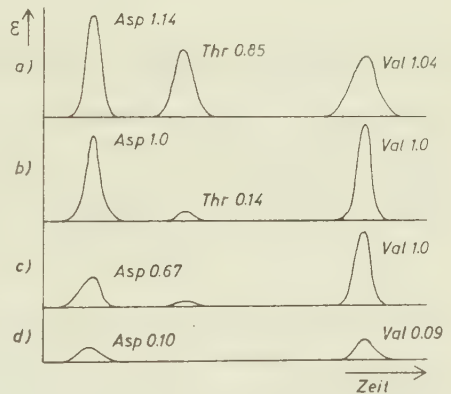


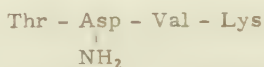
Abbildung 3

Quantitative Analysen von HT α 5 vor und nach dem Abbau mit Phenylsenföhl

Anmerkung zu a): Schon im Ausgangspeptid liegt der Threoninwert niedriger als 1, dies lässt bereits seine N-terminale Position vermuten, da das Peptid durch Besprühen mit verdünntem Ninhydrin auf dem Chromatogramm sichtbar gemacht wurde.

Anmerkung zu c) und d): Die Sequenz des Peptides liegt bereits nach dem 2. Schritt fest, da nur noch 67% Asp (bezogen auf Val) gefunden werden. Der 3. Schritt lässt eine Abnahme von Asp und Val erkennen, dies entspricht den Erwartungen, da die Umsetzung mit Phenylsenföls sowohl an dem Dipeptid Val - Lys als auch an dem noch vorhandenen Tripeptid Asp - Val - Lys erfolgt.

Damit ist die Struktur des Peptides festgelegt zu:



HT α 3¹³⁾: ein Beispiel für stufenweisen EDMAN-Abbau am Papier

1. Gewinnung: Die Reindarstellung dieses Peptides erfolgt aus dem tryptischen Hydrolysat der α -Kette, wie dies auf Seite 4 beschrieben wurde.

Zur sicheren Erkennung am Papier kann neben der Ninhydrin-Reaktion der Histidinrest herangezogen werden: Indazole fluoreszieren im UV, ausserdem kuppelt der Ring mit Diazoniumsalzen zu roten Farbstoffen.

2. Zusammensetzung: Gly₂, His₁, Lys₁.

3. Strukturermittlung: Wegen der 3 basischen Zentren im Peptid HT α 3 erhält man bei der Umsetzung mit FDNB ein so lipophiles Produkt, dass seine Isolierung aus dem Reaktionsgemisch nicht gelingt. Auch beim EDMAN-Abbau¹⁷⁾ sind die Löslichkeitsverhältnisse so ungünstig, dass diese Methode nur auf dem Papier angewendet werden konnte (s. allgemeine Diskussion Seite 25). Es wurde dabei von einer Extraktion des überschüssigen Phenylsenföls abgesehen und statt dessen zur Reinigung das verbleibende Peptid nach dem 1. Abbauschritt rechromatographiert.

Bei der 1. Stufe ergab sich nach 9stündigem Zyklisieren eine Ausbeute von 82% PTH-Glycocoll. Da nach SCHROEDER¹⁸⁾ die Abspaltung von PTH-Histidin nur sehr langsam erfolgt, so wurde beim 2. Schritt 15 Stunden lang zyklisiert.

Aus der quantitativen Analyse der jeweils entstandenen Restpeptide kann die Sequenz wieder unmittelbar abgelesen werden.

Sie lautet:

Gly - His - Gly - Lys

	<u>Gly</u>	<u>His</u>	<u>Lys</u>
a) Analyse des Ausgangspeptids:	1,7	0,81	1,0
b) nach dem 1. Abbauschritt:	<u>1,18</u>	0,79	1,0
c) " " 2. " :	0,96	<u>0,56</u>	1,0

Die ϵ -NH₂-Gruppe des Lysins reagiert ebenfalls mit Phenylsenfö, dadurch erhält man bei der quantitativen Ninhydrinbestimmung eine niedrigere Extinktion, die durch einen Faktor von ungefähr 1,2 ausgeglichen werden kann. Die Tabelle enthält bereits die korrigierten Werte.

Anmerkung zu a): Auch hier wurde - wie bei HT α 5 - die N-terminale Aminosäure durch Besprühen mit Ninhydrin teilweise zerstört, sodass im Totalhydrolysat des Ausgangspeptids der Gly-Wert unter 2,0 liegt.

Anmerkung zu c): Da das Restpeptid nach dem 1. Abbauschritt rechromatographiert wurde, so lag für die 2. Stufe ausschliesslich das Tripeptid His₁, Gly₁, Lys₁ vor. Daraus erklärt sich der Gly-Wert von etwa 1.

Das Methioninpeptid HT α 6¹⁵⁾: ein Beispiel für überlappende fermentative

Spaltung

1. Reinigung: Die α -Kette enthält 2 Methioninpeptide, das hier vorliegende HT α 6 bestimmt als einzige Komponente die Höhe des 3. Gipfels im Eluat aus Gesamtglobin. (s. Abb. 1). Zur Analyse wird das Peptid papierchromatographisch nachgereinigt.

2. Summenformel:

Lys₁, Thr₂, Ser₁, Pro₁, Met₁, Leu₁, Phe₂. Insgesamt = 9 A'säuren.

3. Strukturaufklärung: Aus der Zusammensetzung kann geschlossen werden, dass das Peptid einem fermentativen Abbau leicht zugänglich ist, denn alle Peptidasen hydrolysieren bevorzugt die C- oder N-terminalen Verknüpfungsstellen aromatischer Aminosäuren und die des Leucins. Ebenso sind die beiden Hydroxysäuren Thr und Ser mit ihrem N-Terminus labil im Peptid gebunden.

Lediglich der Prolyl-Rest verhindert einen enzymatischen Angriff am C- und N-terminalen Ende dieser Aminosäure.

Abbildung 4 gibt einen Überblick über die Angriffspunkte der verschiedenen Fermente an diesem Peptid. Es fällt auf, dass lediglich in der unmittelbaren Nachbarschaft des Prolins keine Spaltung erfolgte.

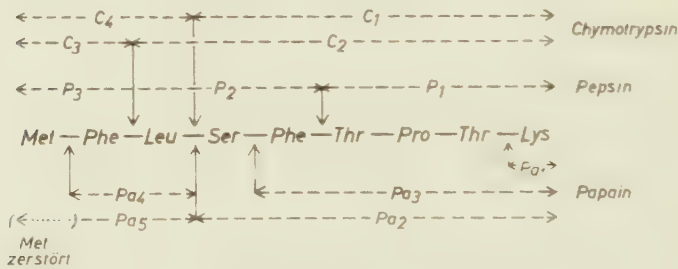


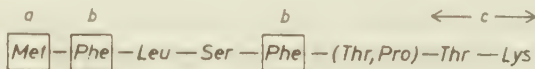
Abbildung 4

Spaltung von HTα 6 mit verschiedenen Proteasen

Die beiden Spaltprodukte Pa₄ und Pa₅ haben dieselbe Aminosäurezusammensetzung, wandern aber mit verschiedenen R_{Leu}-Werten. Wir nehmen an, dass Pa₄ (mit dem höheren R_{Leu}-Wert) ursprünglich dem Tripeptid Met - Phe - Leu entspricht, dass jedoch das zur Aktivierung des Papains notwendige Cyanid¹⁹⁾ den Methioninrest zerstört hat. Aus den Analysen der fermentativ gewonnenen Partialpeptide lässt sich bereits die folgende Teilformel angeben:



Zur Ermittlung der Gesamtstruktur und zur weiteren Sicherung dieser Sequenz wurden noch chemische Abbauprobversuche durchgeführt:



a) Durch Umsetzung mit FDNE ²⁰⁾ an Gesamtpeptid und anschließende Totalhydrolyse konnte Methionin als DNP-Met und damit als N-Terminus chromatographisch identifiziert werden. In der quantitativen Analyse des wässrigen Hydrolysates fehlt diese Aminosäure.

b) Die Hydrazinolyse ²¹⁾ an den beiden peptischen Bruchstücken P₂ (Leu - Ser - Phe) und P₃ (Met - Phe) ergab in beiden Fällen Phenylalanin als carboxylendständigen Rest.

c) Unterwirft man das C-terminale, peptische Partialpeptid (Thr₂, Pro, Lys) der unspezifischen Hydrolyse mit rauchender Salzsäure, so wird neben freiem Thr und Pro das Dipeptid Thr - Lys nachgewiesen.

Es bleibt noch die Sequenz ..Phe - (Thr, Pro) - Thr.. zu sichern. Aus den oben angeführten Gründen ist die N-terminale Position des Prolins bei einem peptischen Bruchstück sehr unwahrscheinlich, ausserdem spricht die bei der Ninhydrinreaktion entstehende rote Farbe gegen Prolin.

Eine Klärung brachte die Umsetzung mit FDNB an diesem Partialpeptid. Zwar können DNP-Thr und DNP-Pro auch im 2dimensionalen Chromatogramm nicht eindeutig zugeordnet werden, da ihre R_f-Werte sehr ähnlich sind, doch unterscheiden sich die beiden DNP-Derivate durch die Lage ihrer Absorptionsmaxima im UV.

DNP-Pro hat ein Extinktionsmaximum bei 385 mμ, alle anderen DNP-Aminosäuren erreichen das Maximum bei 360 mμ.

Die Kurve zeigt, dass DNP-Thr vorliegen muss.

Damit ist die oben angegebene Sequenz dieses Methioninpeptides bewiesen.

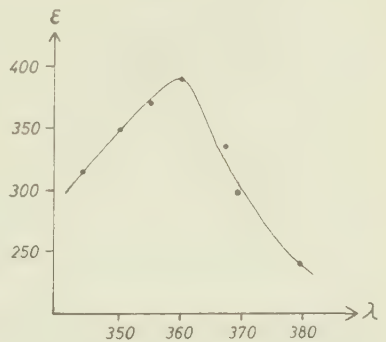


Abbildung 5

UV-Absorptionskurve von DNP-Threonin

Das Peptid HT α 12¹³⁾

Dieses Peptid der Zusammensetzung:

Arg₁, His₁, Glu₃, Gly₃, Ala₄, Val₁, Leu₁, Tyr₁,

insgesamt 15 Aminosäuren, wird seiner negativen Ladung entsprechend erst im 12. Gipfel mit stark essigsauren Puffern eluiert.

Konstitutionsermittlung:

Pepsin zerlegt das Peptid nach 15stündiger Hydrolyse in 3 Bruchstücke, die Summe der in ihnen vorkommenden Aminosäurereste entspricht der Bruttoformel des Ausgangspeptids. Die Partialpeptide wandern im PARTRIDGE-System mit verschiedenen R_{Leu}-Werten und können, neben der Reaktion mit Ninhydrin, durch spezifische Sprühreagenzien²²⁾ auf dem Papier angefärbt werden.

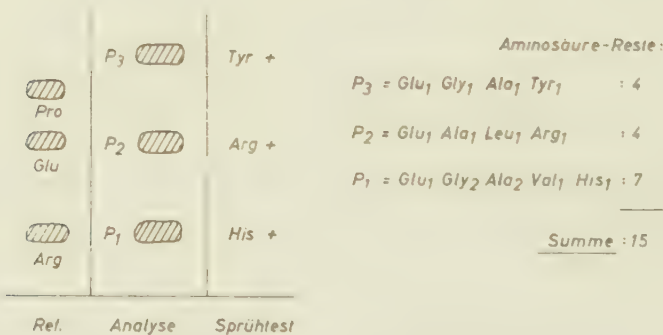


Abbildung 6

Chromatogramm der peptischen Partialpeptide von HT α 12

Die Struktur des Gesamtpeptides wurde gemeinsam mit B. LIEBOLD aufgeklärt, die eigenen Untersuchungen befassen sich mit der Sequenzanalyse an den Partialpeptiden P₂ und P₃.

a) Analyse von P₂:

Das Gesamtpeptid HT α 12 wurde durch tryptische Spaltung gewonnen, deshalb handelt es sich hier um das C-terminale Bruchstück mit Arginin als endständiger Aminosäure.

Die Position von Alanin am N-Terminus folgt aus dem Ergebnis des DNP-Umsatzes. Nach der Totalhydrolyse des DNP-Peptides verhält sich die abgespaltene DNP-Aminosäure chromatographisch identisch mit DNP-Ala, im Hydrolysat des wasserlöslichen Anteiles werden die restlichen 3 Aminosäuren nachgewiesen.

Die unspezifische Hydrolyse mit 12n HCl führt zu 3 Bruchstücken, aus deren Zusammensetzung sich nun die Sequenz unmittelbar ablesen lässt:

ungespaltenes Peptid:	Ala, Leu, Glu, Arg
Spaltprodukte:	Glu, Arg
	Ala, Leu
	Ala, Leu, Glu
daraus folgt:	<u>Ala - Leu - Glu - Arg</u>

b) Analyse von P₃:

Valin nimmt die N-terminale Position mit Peptid HT α 12 ein, es handelt sich demnach bei dem Bruchstück P₃ um den mittleren Bereich. Da dieses Partialpeptid durch peptische Hydrolyse gewonnen wurde, so ist es wahrscheinlich, dass Tyrosin als N-Terminus vorliegt. Die Umsetzung mit FDNB zur Endgruppenanalyse ist wenig geeignet, da di-DNP-Tyrosin sich leicht bei der Hydrolyse zersetzt. Es wurde daher an diesem Peptid der von SJÖQUIST²³⁾ modifizierte stufenweise EDMAN-Abbau durchgeführt; die vorgeschlagenen Bedingungen zur Abspaltung der PTH-Aminosäure erwiesen sich jedoch bei der 2. Stufe als nicht ausreichend, deshalb wurde die Zyklisierung in 1n HCl durchgeführt. Die abgespaltenen PTH-Aminosäuren sind aus dem Chromatogramm (Abb. 7) ersichtlich.

Nach 15stündiger Hydrazinolyse kann die C-terminale Aminosäure als Alanin zugeordnet werden, während eine Mischung aus Carboxypeptidase A + B nach 15stündiger Einwirkung die beiden C-terminalen Aminosäuren im Verhältnis Ala : Glu = 1 : 0,43 abspaltet.

Daraus ergibt sich die Sequenz:

Tyr - Gly - Glu - Ala

Bei beiden Partialpeptiden liegt die Glutaminsäure in freier Form vor, da P₂ in der Hochspannungselektrophorese neutral, und P₃ zur Anode wandert.

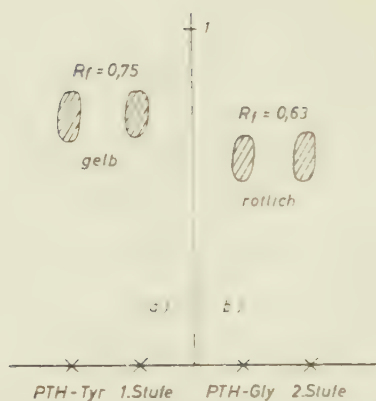
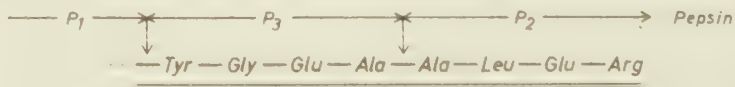


Abbildung 7

Chromatogramm zweier PTH-Aminosäuren des Partialpeptides P_3
 a) nach dem 1. Abbauschritt
 b) " " 2. "

Die C-terminale Struktur von $HT\alpha 12$ lautet demgemäss:



II. Peptide der β -Kette

Sequenzanalyse von $HT\beta 5$ ¹⁴⁾

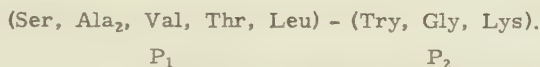
Dieses Peptid ist für die Primärstruktur des Humanhämoglobins besonders interessant. Es konnte nämlich gezeigt werden ²⁴⁾, dass $HT\beta 5$ zwischen den beiden tryptischen Peptiden liegt, in denen bei pathologischen Hämoglobinen der Austausch einer Aminosäure erfolgt. Die Sequenz dieser beiden Peptide ist seit den Arbeiten von HUNT und INGRAM ²⁶⁾ bekannt.

1. Gewinnung: Das basische Peptid kann papierchromatographisch von den übrigen Peptiden des Gipfels 4a getrennt werden, da es im PARTRIDGE-System als schnellste Komponente dieses Extinktionsgipfels wandert.

2. Summenformel:

Lys₁, Thr₁, Gly₁, Ser₁, Ala₂, Val₁, Leu₁, Try₁. Summe: 9 Aminosäuren.

3. Aufklärung: Um das Peptid HTβ 5 zu analysieren, erweist sich die peptische Spaltung als sinnvoll, da dann Hydrolyse an der N-terminalen Bindung des Tryptophans zu erwarten ist. Bei 17stündiger Fermenteinwirkung wird das Peptid quantitativ in die beiden Bruchstücke P₁ und P₂ zerlegt, denen folgende Aminosäuren zukommen:



Die beiden Partialpeptide können pherographisch voneinander getrennt werden, da P₁ neutral und P₂ kathodisch wandert.

Das Partialpeptid P₂

färbt sich mit Ninhydrin rot an und gibt beim Besprühen mit EHRLICH's Reagenz eine positive Tryptophanreaktion. Peptide mit N-terminalem Glykokoll werden bei der Ninhydrinreaktion gelb. Nach der Umsetzung mit FDNB liessen sich im wässrigen Hydrolysat Glykokoll und ε-NH₂-DNP-Lysin nachweisen, während DNP-Try nicht gefasst werden konnte. Auch das nicht substituierte Tryptophan wird bei saurer Hydrolyse zerstört. Aus der roten Färbung des Partialpeptides P₂ mit Ninhydrin und der Spezifität der Pepsinspaltung einerseits und aus der Tatsache, dass kein DNP-Gly erhalten wurde, folgt die Sequenz dieses Bruchstückes zu: ..Try - Gly - Lys.

Eine zusätzliche Stütze für diese Struktur gibt die Sequenz des homologen Bereiches in HTα 8: ..Ala - Try - Gly - Lys.

Strukturermittlung von P₁:

Die gelb-braune Färbung bei der Ninhydrin-Reaktion lässt bereits eine der beiden Hydroxysäuren als aminoendständig erwarten.

a) Die Einwirkung von Carboxypeptidase auf ein DNP-Peptid führt nach bisherigen Erfahrungen bei genügend langer Inkubationszeit zu dem α -NH₂-DNP-Dipeptid, da der enzymatische Abbau an der letzten Verknüpfungsstelle durch den Dinitrophenylrest gehindert wird.

Im vorliegenden Fall wurde nach 13stündiger Einwirkung das DNP-Dipeptid DNP-Ser - Ala gefasst und - nach der Totalhydrolyse - die beiden Bestandteile chromatographisch identifiziert. Die quantitative Analyse der abgespaltenen Aminosäuren enthält kein Serin mehr und nur noch 1 Alanin.

Bei wesentlich kürzerer Hydrolysenzeit (bis zu 3 Stunden) ist nur eine Aminosäure, die C-terminale, abgespalten. Sie wurde als Leucin identifiziert. Auch bei der Hydrazinolyse am Partialpeptid P₁ wird Leucin als carboxylierständig gefunden.

b) 72stündige Hydrolyse mit rauchender Salzsäure bei 37°C führte zu folgenden Bruchstücken:

Ser, Ala	
Ser, Ala, Val ⁺)	⁺) an diesem Partialpeptid
Ala, Val	wurde die C-terminale Po-
	sition des <u>Valins</u> durch
Thr, Ala, Leu	Hydrazinolyse bewiesen.
Ala, Leu	

Aus den Ergebnissen von a) und b) ergibt sich die Struktur von P₁:

Ser - Ala - Val - Thr - Ala - Leu ..

c) unspezifische Spaltungen des Gesamipeptides HT β 5 bestätigen diese Sequenz. (Tryptophan konnte wegen seiner Unbeständigkeit in salzsaurer Lösung nicht gefasst werden)

8stündige Einwirkung von rauchender Salzsäure bei 37°C:

Ala ⁺), Leu	⁺) beim EDMAN-Abbau wird
Ser, Ala, Val, Thr	Alanin als PTH-Aminosäure
Ser, Ala, Val, Thr, Ala, Leu	abgespalten.
<u>Gly, Lys.</u>	

15stündige Subtilisinspaltung führte zu den Partialpeptiden:

Ser, Ala, Val, Thr

Ala, Val, Thr⁺)

Ala, Leu

Gly, Lys

⁺) Die Lage des Threonins im
Tripeptid Ala-Val-Thr wurde
durch Hydrazinolyse ermittelt.

Die Sequenz von HT β 5 lautet demnach:

Ser - Ala - Val - Thr - Ala - Leu - Try - Gly - Lys.

HT β 4¹⁴⁾: Aufklärung eines Peptides mit einer 3fachen Valylsequenz

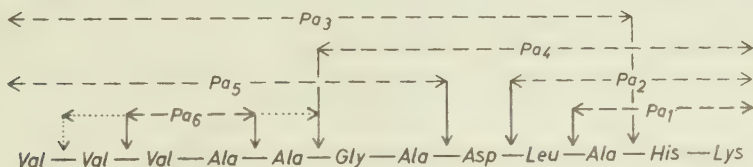
1. Gewinnung: Das stark basische Peptid wird aus dem 1. Gipfel durch Hochspannungselektrophorese oder durch Papierchromatographie in reiner Form isoliert.

2. Zusammensetzung:

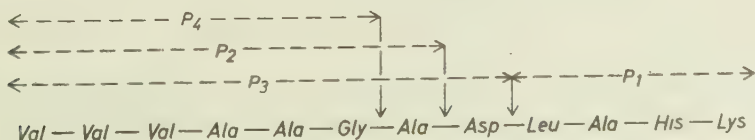
Lys₁, His₁, Asp₁, Gly₁, Ala₄, Val₃, Leu₁. Summe = 12 Aminosäuren.

3. Strukturermittlung: Die Zuordnung der Aminosäuren im C-terminalen Bereich folgt aus enzymatischen Hydrolysen:

Spaltung mit Papain:



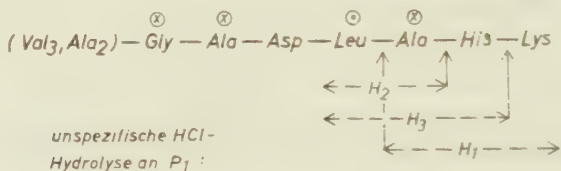
Peptische Hydrolyse:



Durch die Überlappung der fermentativ gewonnenen Bruchstücke kann bereits folgende Partialformel aufgestellt werden:



Sie wird durch chemische Versuche noch zusätzlich gesichert:



⊗ Durch Hydrazinolyse an den Partialpeptiden P_4 , Pa_3 und Pa_5 wurden die C-terminalen Aminosäuren in diesen Spaltprodukten zugeordnet.

⊙ Nachweis der N-terminalen Position in P_1 :

a) als DNP-Leucin

b) als PTH-Leucin; in der quantitativen Analyse des Restpeptides werden nur noch 44% Leucin gefunden (bezogen auf Ala = 100%).

Einen ersten Hinweis auf die N-terminale Sequenz gibt die partielle Säurehydrolyse des DNP-Peptides, denn im Totalhydrolysat der α -NH₂-DNP-Peptide werden folgende Komponenten chromatographisch identifiziert:

Spaltprodukt:	DNP-1	DNP-Val
	" -2	DNP-Val, Val
	" -3	DNP-Val, Val, Ala
	" -4	DNP-Val, Val, Ala, Gly

Dieses Ergebnis gestattet es, die Lage der Aminosäuren in diesem Bereich bis auf zwei Verknüpfungsstellen zuzuordnen:



Der Versuch zeigt, dass qualitative Methoden nicht mehr ausreichen, um die Position von Mehrfachsequenzen in diesem kurzen Abschnitt zu ermitteln. Auch quantitative Analysen sind nur dann sinnvoll, wenn ein Bezugssystem gegeben ist.

Deshalb wurde an dem Gesamtpeptid der stufenweise EDMAN-Abbau am Papier durchgeföhrt. Nach jedem Abbauschritt wurde die PTH-Aminosäure extrahiert und ein aliquoter Teil des Restpeptides vermessen. Die PTH-Aminosäure wurde entweder direkt chromatographisch oder, nach vorangegangener Spaltung mit HJ ²⁷⁾, als freie Aminosäure nachgewiesen.

Zahl der Abbauschritte	Molverhältnis nach 40 ^h Totalhydrolyse				
	Asp	Gly	Ala	Val	Leu
0	0.94	1.09	4.16	2.79	1.0
1	1.04	--+)	--+)	2.34	1.0
2	1.03	1.09	3.99	1.99	1.0
3	1.02	1.10	3.90	1.70	1.0
4	1.04	1.08	3.80	1.49	1.0

Die Tabelle zeigt eine kontinuierliche Abnahme des Valin-Wertes. Die Schwankungen der berechneten Alanin-Werte liegen innerhalb der Messgenauigkeit (2.5%), nach dem 4. Schritt wurde neben PTH-Val auch PTH-Ala im Chromatogramm gefunden.

Aus diesen Ergebnissen folgt die N-terminale Sequenz zu:

Val - Val - Val - Ala - Ala - Gly ...

Folgender Versuch gibt einen zusätzlichen Beweis dafür:

Aus dem peptischen Hydrolysat des Gesamtpeptids lässt sich P₁ pherographisch abtrennen (s. S. 20), so dass der verbleibende Rest (P₃, P₄, P₅ und nicht gefasste Bruchstücke) die Zusammensetzung

Val, Val, Val, Ala, Ala, Gly, Ala, Asp haben muss.

1 2 3 4 5 6 7 8

Nach der Umsetzung mit FDNB wurde das DNP-Peptid-Gemisch mit Carboxypeptidase abgebaut und die abgespaltenen Aminosäuren vermessen.

Ihr Verhältnis geht aus der nebenstehenden Tabelle hervor.

Der Abbau muss quantitativ bis einschliesslich	Asp-NH ₂	1.0
Position (5) erfolgt sein, d.h. es wurden bis hierhin	Gly	1.0
2 Ala, Asp und Gly abgespalten. Für die Stellung	Ala	2.6
(4) und (3) bleibt das Verhältnis Ala : Val = 0.6 : 0.35.	Val	0.36

--+) technischer Fehler während der Analyse, daher nicht auswertbar.

Aus der grösseren Ausbeute an Alanin muss geschlossen werden, dass dies in der Sequenz auf Valin folgt.

Säureamidbestimmung:

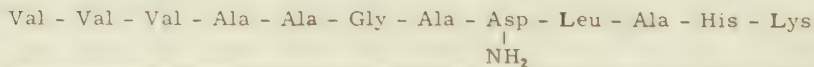
Trennt man die peptischen Partialpeptide nicht chromatographisch sondern durch Hochspannungselektrophorese voneinander, so resultieren lediglich 2 Ninhydrin-positive Banden, von denen die kathodisch wandernde dem Bruchstück P₁ entspricht, während die neutrale Komponente sich als ein Gemisch der N-terminalen Partialpeptide erweist. Daraus geht bereits hervor, dass die freie Carboxylgruppe der Asparaginsäure amidiert ist.

Das Säureamid kann jedoch auch direkt nachgewiesen werden:

Lässt man auf die DNP-Derivate der neutralen Bande in schwach alkalischem Milieu Carboxypeptidase einwirken, so wird die Säureamidbindung unter diesen milden Bedingungen nicht angegriffen. Säureamide verhalten sich bei der quantitativen Analyse wie Serin, deshalb erscheint im Extinktionsdiagramm der abgespaltenen Aminosäuren ein Gipfel, der in seiner Lage dem Serin-peak entspricht, der Asparaginsäure-peak fehlt dagegen.

Wird das enzymatische Hydrolysat jedoch verseift, so tritt der Asparaginsäure-Gipfel wieder auf und der "Serin-peak" verschwindet.

Aus allen Versuchen ergibt sich die Sequenz von HT β 4 zu:



HT β 7¹⁴): Aufklärung eines Peptides mit einer Prolyl-Doppelsequenz.

Gewinnung: Dieses Peptid kann chromatographisch oder durch Elektrophorese aus dem Eluat des 5. Gipfels in analysenreiner Form erhalten werden.

Zusammensetzung:

Lys₁, Glu₃, Thr₁, Pro₂, Ala₂, Val₁, Tyr₁, Phe₁. Summe: 12 Aminosäuren.

Zur Ermittlung der N-terminalen Sequenz wurde das DNP-Peptid der unspezifischen Hydrolyse mit rauchender Salzsäure unterworfen. Nach 41stündiger Einwirkung konnte das α -NH₂-DNP-Dipeptid extrahiert und chromatographisch als

DNP-Glu - Phe

zugeordnet werden.

Der Gehalt an 2 aromatischen Aminosäuren liess auch an HT β 7 besonders günstige Bedingungen für enzymatische Hydrolysen vermuten. Ein fermentatives Partialpeptid mit N-terminalem Phenylalanin ist nicht zu erwarten, da Phe der endständigen Aminosäure benachbart ist. Doch wird auch die Peptidbindung am C-terminalen Ende des Phenylalanins unter den angewandten Bedingungen von keiner der verwendeten Peptidasen gespalten.

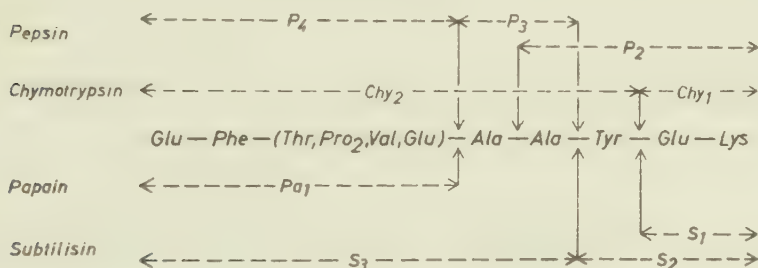


Abbildung 8

Fermentative Hydrolyse von HT β 7

Auch am isolierten Heptapeptid P₄ ist es nicht möglich, mit Subtilisin eine Aufspaltung zu erreichen.

Aus dieser Tabelle folgt:

1. Das N-terminale Heptapeptid verhält sich gegenüber den angewandten Hydrolysen resistent, was sich nur durch die beiden Prolylreste erklären lässt (s. allgemeine Diskussion, Seite 26).
2. Die Sequenz der C-terminalen Aminosäuren ergibt sich aus den enzymatischen Spaltprodukten P₂, P₃ und Chy₁:

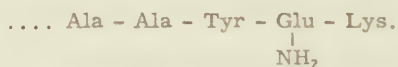
	Ala	Tyr	Glu	Lys
P ₂ :	1.00	+ ⁺)	1.45	1
P ₃ :	2			
Chy ₁ :			1	1

+) Tyrosin wurde bei der Hydrolyse zerstört.

P₃ enthält nur Alanin, der Fleck wandert aber im Chromatogramm sehr viel schneller als Alanin und stellt somit das Dipeptid Ala - Ala dar. P₂ ist vermutlich ein Gemisch aus dem Tripeptid Tyr, Glu, Lys und aus dem Tetrapeptid Ala, Tyr, Glu, Lys. Das ungeradzahlige Verhältnis Ala : Glu = 1.0 : 1.45 weist darauf hin. Die Sequenz Ala-Tyr wird ausser diesen indirekten Hinweis durch die beiden Komponenten von P₂ durch den EDMAN-Abbau wahrscheinlich gemacht: Nach dem 1. Schritt enthält das Restpeptid kein Alanin mehr.

Chy₁ ist das C-terminale Dipeptid Glu - Lys. Es wandert (wie auch P₂, S₁ und S₂) in der Elektrophorese kathodisch, die Glutaminsäure liegt also in amidierter Form vor.

Die Sequenz der 5 C-terminalen Aminosäuren von HT β 7 lautet demnach:



Das N-terminale Partialpeptid P₄: Glu - Phe - (Pro₂, Val, Thr, Glu)

Die erste Schwierigkeit, die sich der Analyse dieses Peptides entgegenstellte, ist seine schlechte Löslichkeit in Wasser und verdünnten Säuren. Während das Gesamtpeptid mit 12 Aminosäureresten spielend in wässrigem Milieu löslich ist, flockt dieses Peptid bei der peptischen Spaltung aus. Löslichkeitsversuche zeigten, dass Pyridin/Wasser 1:1 ein brauchbares Solvens ist.

Zur Strukturermittlung kommt nur noch der stufenweise EDMAN-Abbau oder die unspezifische Säurehydrolyse in Frage. Der Abbau mit PhenylsenföI erschien unrationell, da die Sequenz der beiden N-terminalen Aminosäuren bereits aus dem Versuch an dem DNP-Peptid bekannt ist. 48stündige Spaltung mit 12n HCl bei 37°C zerlegt jedoch das Heptapeptid in folgende Bruchstücke:

H₁: Glu, Phe
H₂: Val, Glu (in geringer Ausbeute)
H₃: Thr, Pro₂, Val, Glu

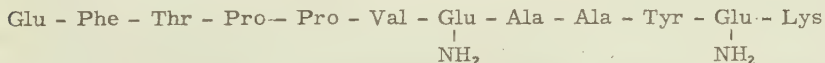
H₃ färbt sich mit Ninhydrin gelb an, der Sprühtest auf N-terminales Prolin ist jedoch negativ. Da aber auch Peptide mit N-terminalem Threonin dann mit Ninhydrin zu einer gelben Verbindung reagieren, wenn keine weitere freie NH₂-Gruppe in der Nähe des N-Terminus vorhanden ist, so wird die entstehende Position dieser Aminosäure wahrscheinlich. Bewiesen wurde sie durch EDMAN-Abbau auf dem Papier: Die quantitative Analyse des Restpeptides enthält nur noch Spuren an Threonin.

Zur Bestimmung der C-terminalen Sequenz in P₄ wurde das Peptid der Hydrazinolyse unterworfen. Im Chromatogramm konnte Glu nachgewiesen werden, allerdings in geringer Ausbeute, da Dicarbonsäuren bei der Umsetzung mit Hydrazin zu 70-80% zerstört werden.

Dasselbe Ergebnis brachte die Hydrolyse mit Carboxypeptidase A+B: Wirkt dieses Ferment über Nacht auf das Peptid ein, so wird Glu-NH₂ quantitativ abgespalten, während die Pro-Val-Bindung noch völlig intakt ist. Auf diese Weise ist es möglich, das Peptid um eine Aminosäure zu verkürzen und nach deren Abtrennung (durch Rechromatographie) an dem entstandenen Hexapeptid die Hydrazinolyse durchzuführen. Bei der Analyse der nunmehr C-terminalen Aminosäure wird Valin gefunden.

Säureamidbestimmung: P₄ wandert in der Hochspannungselektrophorese anodisch, da die C-terminale Glutaminsäure dieses Peptides amidiert ist (Nachweis durch Carboxypeptidase-Spaltung, s.o.), muss die N-terminale Glutaminsäure mit freier Carboxylgruppe vorliegen.

Aus allen Befunden folgt die Gesamtstruktur von HT β 7:



C. Diskussion der Sequenzanalyse

Die Erweiterung der Methodik

1. DNP-Methode

Dieses bereits klassische Verfahren der Eiweissanalyse kann nicht nur zur Endgruppenbestimmung herangezogen werden, sondern es ist auch möglich, die N-terminale Sequenz zu ermitteln, wenn man das DNP-Peptid der unspezifischen Säurespaltung oder der Fermenteinwirkung unterwirft. So wurde bei dem Prolyl-Peptid HT β 7 nach Hydrolyse mit rauchender Salzsäure das α -NH₂-DNP-Dipeptid DNP-Glu-Phe gefasst (s. Seite 21).

Bei dem N-terminalen peptischen Partialpeptid P₁ aus HT β 5 wurde - nach der Umsetzung mit FDNB - mit Carboxypeptidase bis zum DNP-Dipeptid abgebaut (s. Seite 16), da die enzymatische Hydrolyse an der letzten Verknüpfungsstelle durch den DNP-Rest gehindert wird.

Ist ein Peptid so zusammengesetzt, dass mehrere Reste mit FDNB reagieren können, wie z.B. die Seitenketten von Lysin, Tyrosin und Histidin, so wird dadurch die Löslichkeit des DNP-Peptides in organischen Solventien erhöht. Das Peptid HT α 3 wird durch den Eintritt von 3 DNP-Resten in das Molekül so lipophil, dass seine Reinigung von überschüssigem Reagens und von Dinitrophenol nicht mehr möglich ist.

2. Der EDMAN-Abbau

Neben ihrer allgemeinen Anwendbarkeit kommt dieser Methode vor allem bei kurzen Peptidketten eine Bedeutung zu, bei denen fermentativ keine Aufspaltung mehr bewirkt wird. Die Tetrapeptide HT α 3 und HT α 5 sind Beispiele dafür. Auch dann, wenn eine Peptidkette aus sterischen Gründen nicht enzymatisch hydrolysiert werden kann, ist dieses Verfahren zur Sequenzanalyse geeignet.

Ein dritter spezieller Anwendungsbereich liegt bei Mehrfachsequenzen vor, wie z.B. bei der N-terminalen Sequenz Val-Val-Val-Ala-Ala im Peptid HT β 4. Die Methode gestattet eine doppelte Absicherung jeder Sequenz:

1. kann die abgespaltene, N-terminale Aminosäure in Form ihres Thiohydantoinderivates oder, nach Spaltung mit Jodwasserstoffsäure, als freie Aminosäure chromatographisch identifiziert werden, und
2. ist die quantitative Analyse des Restpeptides ein direktes Mass für die Ausbeute an PTH-Aminosäure, was vor allem für die Analyse von Mehrfachsequenzen wichtig ist.

Betrachtet man die vielen Variationen, die zur Durchführung eines stufenweisen Abbaus vorgeschlagen werden, so fällt es auf, dass die Anlagerung des Phenylsenföls stets unter ähnlichen Bedingungen erfolgt, da sie unabhängig von der Art des N-terminalen Restes abläuft. Man arbeitet bei pH 8-10 und kann sowohl Natronlauge als auch tertiäre Amine verwenden. Für die Zyklisierung des Thioharnstoffderivates zur PTH-Aminosäure und die damit verbundene Abspaltung aus dem Peptidverband ist dagegen die Angabe einer allgemein gültigen Vorschrift nicht möglich, da dieser Reaktionsschritt allein von der Natur der endständigen Aminosäure und ihrer Verknüpfung mit der nächstfolgenden bestimmt wird.

Grundsätzlich erfolgt die Zyklisierung und Abspaltung umso leichter, je stärker sauer das Milieu gewählt wird. Die Verwendung einer starken Säure kommt aber nur dann in Frage, wenn es sich lediglich um die Analyse der N-terminalen Aminosäure handelt. Bei einem stufenweisen Abbau verbietet sich dies von selbst, da labile Peptidbindungen hydrolysiert werden können, was - bei Wiederholung der Reaktion - zu mehreren PTH-Aminosäuren und damit zu unklaren Analyseergebnissen führt.

Bei manchen Peptiden, wie z. B. bei HT α 3, wird durch die Anlagerung des Phenylsenföls das Molekül so lipophil, dass es sich bei der Extraktion des überschüssigen Reagenzes mit organischen Lösungsmitteln zu einem grossen Teil darin löst.

In derartigen Fällen ist der stufenweise EDMAN-Abbau am Papier günstiger. Man verzichtet auf die Extraktion und reinigt das Restpeptid vor dem weiteren Abbau durch Rechromatographie. Die nächste Anlagerung von Phenylsenföl kann dann auf dem Chromatogramm erfolgen. Um eine quantitative Analyse an dem jeweiligen Restpeptid durchzuführen, muss die Zahl der Papierstreifen (mit jeweils gleichen Peptidmengen) der Zahl der gewünschten Abbauschritte angepasst werden.

3. Fermentative Spaltungen

Trypsin zeichnet sich durch seine hohe Selektivität aus (s. Seite 3), während die anderen verwendeten Peptidasen weit weniger spezifisch spalten.

Früher hatte man angenommen, dass Pepsin ausschliesslich die N-terminalen Bindungen aromatischer Aminosäuren spaltet, es zeigte sich aber inzwischen, dass sein Wirkungsbereich viel breiter ist. So spaltet es in vielen Fällen auch am C-terminalen Ende aromatischer Aminosäuren, wie z. B. bei HT α 6 die Bindung Phe - Thr und Phe - Leu. Ebenfalls tritt häufig Hydrolyse am Leucin ein, und zwar bevorzugt an dessen N-Terminus, wie bei HT β 4 an der Verknüpfung Asp - Leu. Auch am Alanin beobachtet man peptische Spaltung, wobei sogar die Doppel-sequenz Ala - Ala in mehreren Fällen hydrolysiert wird; HT α 12, HT β 7. Ähnliche Beobachtungen wurden auch an der Ribonuclease²⁸⁾ gemacht.

Auch Chymotrypsin hat ein breiteres Wirkungsspektrum als man bisher angenommen hatte. So spaltet es nicht nur am Carboxylende aromatischer Aminosäuren, sondern, wie in HT α 6 die Bindung Leu - Ser, während die Verknüpfung Phe-Thr unter den angewandten Bedingungen intakt bleibt.

Über die Spezifität des Papains ist noch wenig bekannt. Nach unseren Erfahrungen scheint sich dieses Enzym besonders zur Hydrolyse grösserer Peptide zu eignen.

Peptide, die Prolyl-Bindungen enthalten, werden in der Nähe dieser Aminosäure von den angewandten Peptidasen nicht hydrolysiert, da die Iminogruppe des Prolins eine Abwinkelung der Kette bewirkt, wodurch die Fermenteinwirkung sterisch gehindert wird. Bei HT α 6, das nur ein Prolin enthält, werden die beiden benachbarten Aminosäuren von keinem der Fermente abgespalten, während bei HT β 7 mit der Prolyl-Doppelsequenz die Verknüpfung von 7 Aminosäuren unangegriffen bleibt.

D. Der homologe Bau der Polypeptidketten

Durch die Arbeiten von BRAUNITZER und RUDLOFF¹³⁾ an der α -Kette, bzw. von BRAUNITZER und HILSCHMANN¹⁴⁾ an der β -Kette ist die Lage sämtlicher tryptischer Peptide des Humanhämoglobins A in den nativen Peptidketten bekannt.

Aus den abgebildeten Partialformeln der beiden Ketten geht die Position der hier beschriebenen Peptide hervor (rot eingezeichnet).

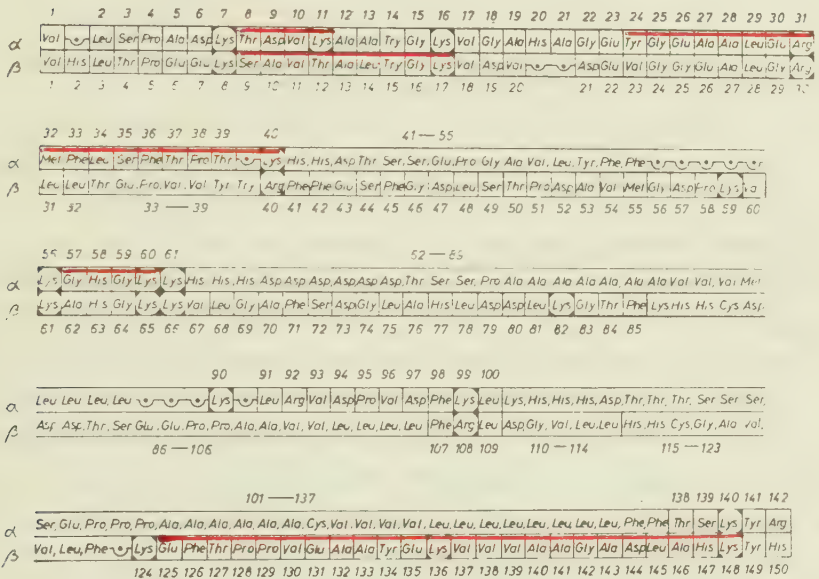
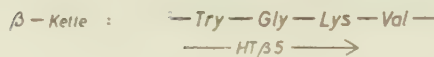
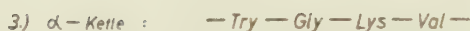
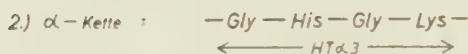
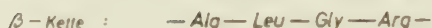
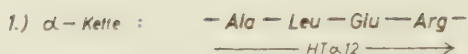


Abbildung 9

Partialformeln der α - und β -Kette des adulten menschlichen Globins

Auffallend ist der homologe Bau¹⁵⁾ der beiden Ketten, der nicht nur - wie folgende Beispiele zeigen - ähnliche Sequenzen erkennen lässt (1. Beispiel), sondern sogar völlig identische Abschnitte enthält (2. und 3. Beispiel):



Die ähnlichen Sequenzen in den bereits aufgeklärten Bereichen der beiden Polypeptidketten lassen auch einen analogen Bau der noch unbekannten Abschnitte erwarten.

Interessant sind in diesem Zusammenhang die Befunde, die MATSUDA²⁹⁾ bei seinen Arbeiten an der α -Kette des Pferdehämoglobins erhielt. Die tryptischen Peptide unterscheiden sich in der Bruttozusammensetzung entweder garnicht oder nur durch den Austausch weniger Aminosäuren von den entsprechenden Peptiden der α -Kette des menschlichen Hämoglobins.

Seit den Arbeiten von HUNT³⁰⁾ und von SCHROEDER³¹⁾ weiss man, dass adultes und fötales Humanhämoglobin identische α -Ketten haben.

Mit der weit hin homologen Primärstruktur von α - und β -Kette des Humanhämoglobins A kann die von PERUTZ⁷⁾ gefundene homologe Tertiärstruktur erklärt werden.

E. Vervielfachung von Sequenzen

Die mögliche Bedeutung der Prolyl-Doppelsequenz für die Tertiärstruktur des Hämoglobinmoleküls

Betrachtet man die Partialformeln der beiden Polypeptidketten, so fällt neben dem homologen Bau die Häufung von Sequenzen auf, wie z. B. in der β -Kette die Folgen

<u>Glu-Glu,</u> 6-7	<u>Gly-Gly,</u> 24-25	<u>Leu-Leu,</u> 31-32	<u>Phe-Phe,</u> 41-42
<u>Asp-Asp,</u> 79-80	<u>Pro-Pro,</u> 125-126	<u>Lys-Lys,</u> 65-66	<u>Val-Val-Val</u> 134-135-136

In den bisher aufgeklärten Peptiden des Humanhämoglobins kommt die Sequenz Ala-Ala viermal vor; in der Ribonuclease tritt noch zusätzlich die Tripelsequenz Ala-Ala-Ala auf.

Auch Aminosäurefolgen wiederholen sich. So ist die Sequenz Try-Gly-Lys im Humanglobin A zweimal enthalten und ist auch ein Bestandteil des Corticotropins³²⁾ und des α -MSH³³⁾ des Schweins, wogegen beim β -MSH von Rind³⁴⁾ und Schwein³⁵⁾ Lysin durch Serin ersetzt ist und die Sequenz dann Try-Gly-Ser lautet. Diese Häufung von Aminosäuren und Sequenzabschnitten lässt vermuten, dass darin ein allgemeines Bauprinzip von Eiweißstoffen vorliegt.

Beim Hämoglobin ist die Bedeutung der Doppelsequenz Glu-Glu in den Positionen 6 und 7 der β -Kette bekannt, denn hier kann bei pathologischen Hämoglobinen ein Aminosäureaustausch^{25, 26)} stattfinden. Bei der Sichelzellenanämie ist die Glutaminsäure in Stellung 6 durch Valin ersetzt, während beim Hämoglobin G der Austausch in der Position 7 erfolgt:

Hämoglobin A	Val-His-Leu-Thr-Pro-GLU-GLU-Lys-
" S	-VAL-Glu-....
" C	-LYS-Glu-....
" G	-Glu-GLY-....

Es ist möglich, dass auch der Prolyl-Doppelsequenz im Peptid HT β 7 eine besondere Bedeutung zukommt.

Aus der schematischen Abbildung 11 der Tertiärstruktur¹⁾ geht hervor, dass die beiden Ketten zwar ähnlich, jedoch nicht völlig identisch gebaut sind. Die β -Kette macht in der Nähe des Carboxylendes eine viel schärfere Wendung als die α -Kette. (s. Pfeile in der Abbildung.)

Führt man den homologen räumlichen Bau der beiden Ketten auf ihre homologe Primärstruktur zurück und überträgt man das Modell vom Pferdehäemoglobin auf das Humanhäemoglobin, so lässt sich der scharfe Knick in der β -Kette durch die Prolyl-Doppelsequenz im Peptid HT β 7 erklären, da sie eine zweimalige Abwinkelung im primären Bau der Polypeptidkette zur Folge hat.

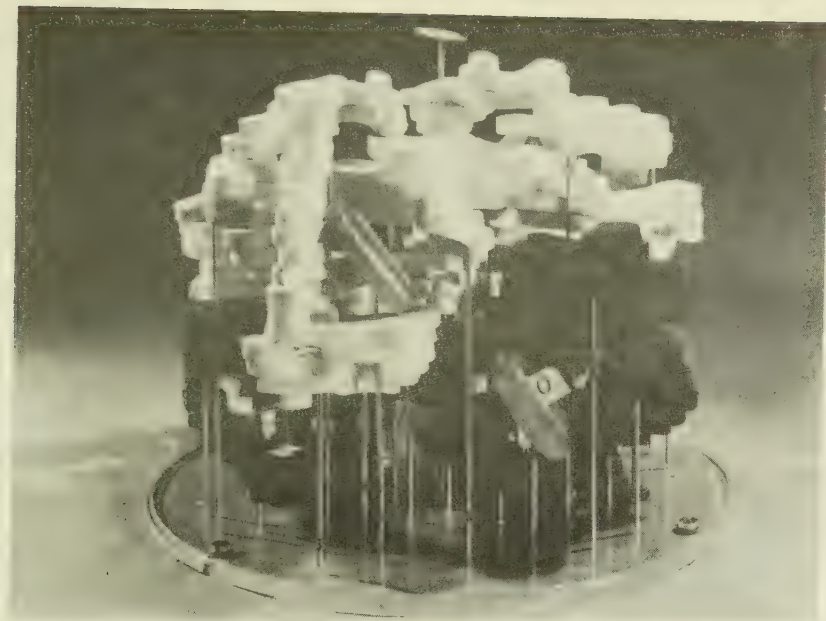


Abbildung 10
Tertiärstruktur des Hämoglobins
(Modell nach PERUTZ)

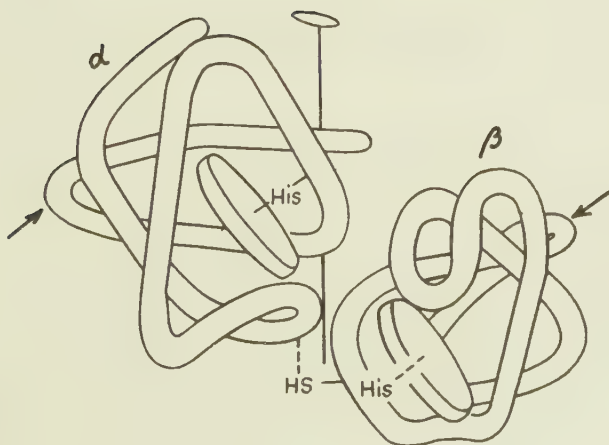


Abbildung 11
Schematisches Bild der beiden Polypeptidketten

Experimenteller Teil

A. Allgemeine Methoden

I. Reindarstellung der Peptide

1. Die Hochspannungselektrophorese wird bei Spannungen von 50-300 V/cm auf Schleicher-Schüll-Papier Nr. 2043b unter Toluol- und zusätzlicher Wasserkühlung durchgeführt.

Folgende Pufferlösungen werden verwendet:

- a) Kollidin-Acetatpuffer: 3% 2.4.6-Kollidin, 0.25% Essigsäure; pH = 7.6
- b) Pyridin-Acetatpuffer: 5% Pyridin, 0.2% Essigsäure; pH = 6.3.

2. Bei der Verteilungschromatographie am Papier werden folgende Lösungsmittelgemische verwendet:

saure Systeme:

- a) PARTRIDGE-System: n-Butanol/Eisessig/Wasser (=BEW) 4:1:5 (Oberphase)
- b) modifiziertes PARTRIDGE-System: BEW = 3:1:1 (eine Phase)

basische Systeme:

- c) Phenol/Boratpuffer (pH 8.3) = 8:2 (eine Phase)
- d) Phenol/m-Kresol/Boratpuffer (pH 9.3) = 25:25:7 (eine Phase)
- e) Phenol - 0.1% Ammoniak.

Die Chromatographie erfolgt auf Schleicher-Schüll-Papier Nr. 2043b oder auf Whatman-1-Papier.

Zur Isolierung der tryptischen Peptide aus dem Eluat der betr. Extinktionsgipfel ist eine Kombination der Methoden 1. und 2. nicht erforderlich, da die einmalige Trennung ausreicht, um die Peptide analysenrein zu erhalten.

Handelt es sich jedoch darum, Bruchstücke der Peptide oder Aminosäuren voneinander zu trennen, so werden die beiden Verfahren oft kombiniert. Die Durchführung wird bei der Aufklärung der einzelnen Peptide beschrieben.

II. Zur Erkennung der Peptide und Aminosäuren am Papier dienen Farbreaktionen.

1. Der Ninhydrin-Test: Das trockene Chromatogramm (bzw. Pherogramm) wird mit Reagens besprüht und die Farbe bei 90–110°C entwickelt. Handelt es sich um Peptide, die noch weiter untersucht werden sollen, so befeuchtet man nur schwach mit einer 0.02proz. Ninhydrinlösung. Sobald die Farbe auftritt, wird die Substanz mit verdünnter Säure vom Papier eluiert, um eine weitere Umsetzung mit dem Reagens zu vermeiden.

0.02proz. Ninhydrinlösung: 200 mg Ninhydrin, 150 ml H₂O, n-Butanol ad 1000 ml.

Zur Identifizierung von Aminosäuren und solchen Peptiden, die nicht weiter untersucht werden, verwendet man 0.1proz. Ninhydrinlösung, die einen Kollidin-zusatz enthält. Die einzelnen Komponenten färben sich damit verschieden an.

0.1proz. Ninhydrinlösung: 1 g Ninhydrin, 40 ml 2.4.6-Kollidin,
300 ml Eisessig, n-Butanol ad 1000 ml.

2. Zusätzliche, spezifische Farbreaktionen auf Tryptophan, Tyrosin, Histidin, Arginin und Prolin werden nach DURRUM, BLOCK und ZWEIG²²⁾ ausgeführt.

III. Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung

Zur Totalhydrolyse wird die Substanz (0.5–1 µMol) in 2 ml 5.7n HCl aufgenommen, unter Stickstoff eingeschmolzen und 20 Stunden lang auf 110°C erhitzt. (Abänderungen werden bei den einzelnen Peptiden aufgeführt.)

Der qualitative Nachweis erfolgt durch 1- oder 2dimensionale Papierchromatographie.

Die quantitativen Analysen wurden nach STEIN und MOORE im Gerät der Firma Beckman-Instruments oder nach HANNIG im Apparat der Firma Bender und Hobeln durchgeführt. Der wesentliche Unterschied der beiden Geräte besteht darin, dass der Amino-Acid-Analyzer von STEIN und MOORE die Extinktion in logarithmischem Masstab aufträgt, während das Gerät von HANNIG linear registriert. Daher kommt es, dass der Messbereich beim STEIN- und MOORE-Apparat wesentlich grösser und bei kleinen Konzentrationen die Empfindlichkeit höher ist. Eine ausführliche Beschreibung der Technik findet sich bei G. BRAUNITZER, Angew. Chem. 72, 485, (1960).

IV. Chemische Methoden zur Sequenzanalyse

1. Die von SANGER ³⁾ eingeführte Endgruppenbestimmung mit FDNB wird nach dem von LEVY ²⁰⁾ verbesserten Verfahren durchgeführt, wobei die DNP-Aminosäuren nach der Hydrolyse chromatographisch und teilweise auch photometrisch identifiziert werden. Ausserdem werden die DNP-Derivate spezifischen und unspezifischen Spaltungen unterworfen und die DNP-Partialpeptide nach LEVY aufgearbeitet.

2. Dem stufenweisen EDMAN-Abbau am Papier wird die Vorschrift von FRAENKEL-CONRAT ¹⁷⁾ zugrunde gelegt, während als Richtlinien für den EDMAN-Abbau in Lösung neben dem dort angegebenen Verfahren die Arbeiten von SJÖQUIST ²³⁾ dienen.

Variationen der Methodik 1. und 2. werden bei den einzelnen Peptiden beschrieben.

3. Die Spaltung mit Hydrazin zur C-terminalen Endgruppenanalyse erfolgt analog der von BRAUNITZER ²¹⁾ am Tabakmosaikvirus beschriebenen Versuche.

4. Zur unspezifischen Säurehydrolyse wird das Peptid oder sein DNP-Derivat mit 12n (= rauchender) Salzsäure bei 37°C behandelt. Die Dauer der Spaltung richtet sich nach den vorliegenden Aminosäureresten.

V. Die enzymatischen Hydrolysen

werden bei 37° in einer Fermentkonzentration von 50-100 γ / μ Mol Peptid durchgeführt. Die Einstellung des erforderlichen pH-Wertes erfolgt im pH-Meter oder gegen Lyphanpapier.

1. Pepsinspaltung:

Zur Verwendung gelangt 2mal kristallisiertes Pepsin der Nutritional Biochem. Corp. New Jersey. Die Hydrolyse erfolgt in 1/16n HCl, pH etwa 1.3.

2. Papainspaltung:

Die wässrige Peptidlösung wird mit 1/100n NaOH auf pH 7.0-7.2 eingestellt. Das Ferment muss vor seiner Anwendung aktiviert werden ¹⁹⁾. Dazu inkubiert man 5 mg Papain in 0.5 ml 1proz. NaCN-Lösung eine Stunde lang bei 37°.

3. Chymotrypsinspaltungen werden bei pH 8.0 durchgeführt.

Präparat der Nutritional Biochem. Corp. Cleveland, Ohio.

4. Subtilisin: Ebenfalls Spaltung bei pH 8.0. Enzympräparation nach AKABORI.
5. Carboxypeptidase A: wässrige Suspension, Fa. Serva, Heidelberg.
6. Carboxypeptidase A+B: wässrige Suspension, Worthington, Biochem. Corp.

Carboxypeptidase-Spaltungen werden bei pH 8.0 durchgeführt. Man löst das suspendierte Ferment vor der Inkubation in 10% LiCl-Lösung. Für die Menge, die 500 γ Ferment entspricht, werden 0.3 ml 10% LiCl-Lösung benötigt.

B. Durchführung der Analysen

I. Das Peptid HT α 5:

Gewinnung: Etwa 4 μ Mol Peptid werden durch absteigende Chromatographie in BEW in reiner Form gewonnen ($R_{Leu} = 0.20$) und mit 10proz. Essigsäure vom Papier eluiert.

Zur quantitativen Analyse wird der vierte Teil totalhydrolysiert. Molverhältnis ³⁶⁾

<u>Lys</u>	<u>Asp</u>	<u>Thr</u>	<u>Val</u>
1.0	1.14	0.85	1.04

Die restlichen 3 μ Mol werden nach FRAENKEL-CONRAT dem stufenweisen EDMAN-Abbau in Lösung unterworfen. Die Zyklisierung des PTC-Peptides erfolgt jedoch - abweichend von der dort beschriebenen Methode - bei jeder Stufe 6 Stunden lang bei 25°C in 4 ml Eisessig, HCl-gesättigt. Insgesamt werden 3 Abbauschritte durchgeführt und jeweils 1 μ Mol des Restpeptides vermessen:

(Totalhydrolyse: 2 ml 5.7n HCl, N₂, 110°C, 20 Stunden.)

	<u>Asp</u>	<u>Thr</u>	<u>Val</u>
nach dem 1. Schritt	1.0	<u>0.14</u>	1.0
" " 2. "	<u>0.67</u>	---	1.0
" " 3. "	0.1	---	<u>0.1</u>

Zusätzlich erfolgt die Identifizierung der abgespaltenen PTH-Aminosäuren nach den ersten beiden Schritten durch absteigende Chromatographie im System Pyridin/n-Heptan = 3:7. Die PTH-Aminosäuren können nach FEIGL ³⁷⁾ sichtbar

gemacht werden durch Besprühen mit einer Mischung von Jod- und NaN_3 -Lösung, denn die äusserst langsam verlaufende Reaktion:



wird durch Schwefelverbindungen katalytisch beschleunigt. Man erkennt die PTH-Aminosäuren an der Entfärbung des Chromatogramms.

II. Das Peptid HT α 3:

- Gewinnung: 1. absteigende Chromatographie in BEW, $R_{\text{Leu}} = 0.04$
 2. Elektrophorese in Pyridin-Acetatpuffer, 100 V/cm,
 40 Minuten; das Peptid wandert kathodisch, $R_{\text{Lys}} = 1.0$.

Quantitative Analyse:

<u>Gly</u>	<u>His</u>	<u>Lys</u>
1.96	0.95	1.17

Die Vermessung des Totalhydrolysats erfolgt nur auf der "basischen" Säule, da das Peptid keine sauren und nur eine neutrale Komponente enthält. Diese wird mit der Front eluiert und erscheint im Extinktionsdiagramm als erster Gipfel.

Zur Sequenzanalyse werden 3 μMol HT α 3 papierchromatographisch isoliert und durch Besprühen mit verdünntem Ninhydrin sichtbar gemacht. Die Bande, die das Peptid enthält, wird ausgeschnitten, bei 60° 2 Stunden lang nachgetrocknet, um die letzten Reste Eisessig zu entfernen und dem stufenweisen EDMAN-Abbau am Papier ausgesetzt. Aus den auf S. 25 angeführten Gründen unterbleibt jedoch die Reinigung des PTC-Peptides, statt dessen wird nach der Anlagerung des Phenylsenföls der Papierstreifen über NaOH und Paraffin im Hochvakuum getrocknet um überschüssiges Reagens zu entfernen.

Auch auf die Extraktion der PTH-Aminosäure wird verzichtet, $\frac{1}{3}$ des Restpeptides vermessen und das für den weiteren Abbau vorgesehene Peptid durch Rechromatographie gereinigt. R_{Leu} in BEW etwa 0.01. Erkennung durch UV-Fluoreszenz. Beim 1. Abbauschritt wird 9 Stunden lang zyklisiert, beim 2. Schritt 15 Stunden lang, da die Abspaltung von PTH-Histidin nur sehr langsam erfolgt.

Analysenergebnis:	<u>Gly</u>	<u>His</u>	<u>Lys</u>
nach dem 1. Abbauschritt:	<u>1.18</u>	0.79	1.0
" " 2. " "	0.96	<u>0.56</u>	1.0

III. Das Peptid HT α 6

Reinigung: papierchromatographisch in BEW, $R_{\text{Leu}} = 0.71$.

Elution mit 10proz. Essigsäure.

Aminosäureverhältnis ³⁶⁾:

<u>Lys</u>	<u>Thr</u>	<u>Ser</u>	<u>Pro</u>	<u>Met</u>	<u>Leu</u>	<u>Phe</u>
1.0	1.91	0.98	0.85	0.95	1.13	2.11

Strukturermittlung:

1. Endgruppenbestimmung mit FDNB: Das DNP-Peptid wird 16 Stunden lang mit 5.7n HCl bei 110° totalhydrolysiert und die α -DNP-Aminosäure im Toluol-system nach LEVY chromatographiert. Es resultieren 2 gelbe Banden mit den R_f -Werten 1.2 und 0.5 (bezogen auf DNP-Valin = 1.0). Die niedriger wandernde Bande ist schwächer ausgebildet und als ein Zersetzungsprodukt anzusehen. Wahrscheinlich handelt es sich um DNP-Met-SO₂. Methionin fehlt in der quantitativen Analyse des Restpeptides:

<u>Thr</u>	<u>Ser</u>	<u>Pro</u>	<u>Met</u>	<u>Leu</u>	<u>Phe</u>
1.78	0.89	1.3	---	1.23	1.78

2. Fermentative Hydrolysen:

a) 16stündige Pepsineinwirkung führt zu einer quantitativen Aufspaltung in die Partialpeptide P₁, P₂ und P₃, die durch absteigende Chromatographie in BEW voneinander getrennt werden.

Ihre qualitative Zusammensetzung ergibt sich nach 16stündiger Totalhydrolyse (110°/5.7n HCl / unter N₂) durch 2dimensionale Papierchromatographie in BEW und Phenol/Boratpuffer (pH 8.3)

	R_{Leu}	Lys	Thr	Ser	Pro	Leu	Phe	Met
P ₁	0.16	+	+	-	+	-	-	-
P ₂	1.11	-	-	+	-	+	+	-
P ₃	1.18	-	-	-	-	-	+	+

b) 4stündige Spaltung mit Chymotrypsin und Isolierung der Bruchstücke wie oben beschrieben.

Totalhydrolyse: 20 Stunden/110°/6n HCl/unter N₂.

Die Analysen der 4 Partialpeptide zeigen folgende Zusammensetzung:

	R _{Leu}	Lys	Thr	Ser	Pro	Leu	Phe	Met
C ₁	0,25	1,0	1,85	0,93	1,16	---	1,07	---
C ₂	0,43	1,0	1,94	1,00	1,07	1,07	1,00	---
C ₃	1,26	-	-	-	-	-	+	+
C ₄	1,40	-	-	-	-	+	+	+

c) nach 24stündiger Papainhydrolyse von 1,5 µMol HTα 6 resultieren im Chromatogramm (entwickelt in BEW) 5 Partialpeptide, denen folgende Aminosäuren zuzuordnen sind: (1dimensionale Auftrennung des Totalhydrolysats im PARTRIDGE-System)

	R _{Leu}	Lys	Thr	Ser	Pro	Leu	Phe	Met
Pa ₁	0,09	+	-	-	-	-	-	-
Pa ₂	0,25	+	+	+	+	-	+	-
Pa ₃	0,34	+	+	-	+	-	+	-
Pa ₄	1,15	-	-	-	-	+	+	-
Pa ₅	1,20	-	-	-	-	+	+	(+)

3. Bei der Hydrazinolyse der peptischen Partialpeptide P₂ und P₃ beträgt die Reaktionszeit 4 Stunden, die Umsetzung zur "SCHIFF'schen Base" erfolgt mit Isovaleraldehyd. Die abgespaltenen, C-terminalen Aminosäuren werden papierchromatographisch in beiden Fällen als Phenylalanin identifiziert.
Systeme: BEW; Phenol/Kresol/Boratpuffer (pH 9,3)

4. Sequenzanalyse an dem peptischen Partialpeptid P₁:

a) unspezifische Säurehydrolyse von 1 µMol P₁, Dauer 22 Stunden.
Nach der üblichen Isolierung der Bruchstücke in BEW und ihrer Totalhydrolyse werden die Aminosäuren qualitativ in demselben System zugeordnet:

H ₁	R _{Leu} = 0,05	rot m. Ninhydrin	Thr, Lys
H ₂	" 0,37	bräunlich "	Thr
H ₃	" 0,5	gelb	Pro

b) Endgruppenbestimmung: 3 μ Mol P_1 werden in das DNP-Derivat übergeführt. Bei der Totalhydrolyse wird auf die quantitative Abspaltung der α -DNP-Aminosäure verzichtet und nur 2 Stunden lang bei 100°C in rauchender HCl hydrolysiert. Falls N-terminales Prolin vorliegt, so kann das DNP-Derivat unter diesen Bedingungen gefasst werden, während es bei schärferer Hydrolyse zerstört wird. Der papierchromatographische Nachweis der α -DNP-Aminosäure ist nicht eindeutig, da DNP-Thr und DNP-Pro sowohl im Toluolsystem als auch im Phosphatpuffer mit sehr ähnlichen R_f -Werten wandern. Deshalb wird die DNP-Aminosäure mit 1proz. NaHCO_3 -Lösung vom Chromatogramm eluiert und die Absorptionskurve im Bereich von 345-385 m μ aufgenommen.

IV. Das Peptid HT α 12:

Reinigung: Durch absteigende Chromatographie in BEW, $R_{\text{Leu}} = 0.37$. Erkennung am Papier: neben der Ninhydrinreaktion durch Sprühteste auf Arginin, Histidin und Tyrosin.

Quantitative Analyse ³⁶⁾.

<u>Arg</u>	<u>His</u>	<u>Glu</u>	<u>Gly</u>	<u>Ala</u>	<u>Val</u>	<u>Leu</u>	<u>Tyr</u>
0.91	0.95	2.99	3.0	3.91	1.07	0.99	0.78

Konstitutionsermittlung:

Wie auf Seite 12 beschrieben wurde, spaltet Pepsin bei 15stündiger Einwirkung quantitativ in 3 Bruchstücke:

P_1 :	$R_{\text{Leu}} = 0.25$	(His +)	
P_2 :	"	0.45 (Arg +)	P_2 und P_3 werden weiter
P_3 :	"	0.60 (Tyr +)	untersucht.

Das Partialpeptid P_2 : Die chromatographische Trennung des Totalhydrolysates im PARTRIDGE-System ergibt Leu, Ala, Glu, Arg in äquimolaren Mengen.

1. Die Totalhydrolyse von 1 μ Mol DNP-Peptid wird 16 Stunden lang in 12n HCl bei 110° ausgeführt. Die abgespaltene α -DNP-Aminosäure verhält sich im Toluolsystem identisch mit DNP-Ala; im Chromatogramm der wasserlöslichen Aminosäuren sind neben Leu, Glu und Arg nur noch Spuren an Alanin enthalten (rückgespaltenes DNP-Derivat).

2. Die unspezifische Spaltung mit rauchender Salzsäure erfolgt bei 37° 20 Stunden lang mit 2 µMol Peptid. Die Partialpeptide können durch 1-d-Chromatographie in BEW voneinander getrennt werden. Nach ihrer Totalhydrolyse weisen sie folgende Aminosäurezusammensetzung auf:

	R _{Leu}	Arg-Test	Ala	Leu	Glu	Arg
H ₁	0.24	+	-	-	+	+
H ₂	0.95	-	+	+	+	-
H ₃	1.04	-	+	+	-	-

Das Partialpeptid P₃: Um Zersetzung von Tyrosin zu vermeiden, wird die Totalhydrolyse in 5.7n HCl bei 100°C 15 Stunden lang ausgeführt. Identifizierung der Aminosäuren wie bei P₂: Tyr, Ala, Glu, Gly in gleichen Mengen.

1. Stufenweiser EDMAN-Abbau in Lösung nach SJÖQUIST:

Beim 1. Abbauschritt wird die Methode unverändert übernommen, die Anlage- rung des Phenylsenföls erfolgt 2mal in derselben Weise. Die abgespaltene PTH- Aminosäure kann bei aufsteigender Chromatographie im System n-Heptan/n-Bu- tanol/Ameisensäure 4:4:2 durch Vergleich mit authentischem Material als PTH-Tyrosin identifiziert werden. R_f = 0.75. Nach dem Entwickeln mit Jod- NaN₃ färbt sich der Fleck gelb an.

Auch bei der 2. Stufe wurde zunächst in derselben Weise gearbeitet, da aber keine PTH-Aminosäure nachgewiesen werden konnte, wird die Zyklisierung unter schärferen Bedingungen wiederholt: 1n HCl, 40°C, 2 Stunden. Die abge- spaltene PTH-Aminosäure verhält sich bei der Chromatographie (wie oben) identisch mit PTH-Gly. R_f = 0.63, der Fleck ist rötlich gefärbt.

Analyse von 1 µMol Restpeptid nach dem 2. Abbauschritt:

<u>Glu</u>	<u>Gly</u>	<u>Ala</u>	<u>Tyr</u>
0.9	0.62	1.0	0.2

2. 15stündige Hydrazinolyse von 2 µMol P₃ ergibt bei absteigender Chromato- graphie in Phenol/Boratpuffer (pH 8.2) Alanin als C-terminale Aminosäure.

3. Abbau mit Carboxypeptidase A+B: Nach der Entnahme eines aliquoten Teils nach 40 Minuten bzw. nach 2 Stunden erhält man bei der Chromatographie in BEW neben Restpeptid jeweils nur eine Ninhydrin-positive Bande mit dem R_{Leu}- Wert von Alanin. Bei 15stündiger Fermenteinwirkung werden Alanin und Glut- aminsäure im Verhältnis 1 : 0.43 abgespalten.

Säureamidbestimmung durch Hochspannungselektrophorese von P_2 und P_3 in Pyridin-Acetatpuffer bei 300 V/cm, 30 Minuten;

P_2 wandert schwach kathodisch, (Neutralpeptid) $R_{Lys} = 0.12$

P_3 wandert anodisch, $R_{Asp} = 0.30$.

Demnach liegen beide Glutaminsäuren in freier Form vor.

V. Das Peptid HT β 5:

Gewinnung: durch absteigende Papierchromatographie in BEW, $R_{Leu} = 0.52$.

Zur Erkennung am Papier kann neben der Ninhydrinreaktion auch der Tryptophan-Test mit Ehrlich's Reagens herangezogen werden.

Bei der Verwendung des Elutionsgipfels 4a aus Versuch Nr. XXX ist HT β 5 als einziges Peptid in diesem enthalten und kann ohne Vorreinigung zur quantitativen Analyse und zur peptischen Spaltung herangezogen werden.

Zusammensetzung³⁶⁾:

<u>Lys</u>	<u>Thr</u>	<u>Ser</u>	<u>Gly</u>	<u>Ala</u>	<u>Val</u>	<u>Leu</u>	<u>Try</u>
1.00	0.89	0.92	1.09	2.00	1.09	1.08	+))

+) Tryptophan wird bei der Totalhydrolyse zerstört.

Sequenzanalyse:

Zur Pepsinspaltung wird das Peptid mehrmals mit 1/16n HCl rotationsverdampft, um die Elutionspuffer durch Salzsäure zu verdrängen. Nach 17stündiger Fermenteinwirkung bei pH 1.3 erhält man quantitativ die Partialpeptide P_1 und P_2 , die sich pherographisch voneinander trennen lassen; Pyridin-Acetatpuffer, 130 V/cm, 45 Minuten.

	<u>R_{Lys}</u>	<u>Try-Test</u>	<u>Ninhydrinfarbe</u>	<u>Elutionsmittel</u>
P_1	0.15	-	gelb-braun	5proz. Essigsäure
P_2	0.59	+	rot-violett	Wasser

Nach der Totalhydrolyse (20 Stunden / 5.7n HCl / 110°C / unter N_2) wird die Zusammensetzung von P_1 quantitativ, von P_2 qualitativ (durch Chromatographie in BEW) ermittelt:

	<u>Thr</u>	<u>Ser</u>	<u>Ala</u>	<u>Val</u>	<u>Leu</u>
P ₁ :	1.02	0.96	1.97	1.05	1.08
	<u>Gly</u>	<u>Lys</u>	<u>Try</u> : im Totalhydrolysat nicht mehr nachweisbar.		
P ₂ :	+	+			

Umsetzung von jeweils 3 µMol der beiden Partialpeptide mit FDNB: Nach 6stündiger Totalhydrolyse von DNP-P₂ (5.7n HCl, 105°C) ist die chromatographische Zuordnung von DNP-Try nicht eindeutig, doch werden im Chromatogramm der wasserlöslichen Anteile neben Tryptophan-Zersetzungsprodukten und ungespaltenen DNP-Peptiden (kurze Hydrolysenzeit!) freies Glykokoll und ε-DNP-NH₂-Lysin gefunden.

a) $\frac{1}{3}$ des DNP-Peptides P₁ wird 13 Stunden lang bei 25° mit Carboxypeptidase A inkubiert, das DNP-Restpeptid mit Essigester extrahiert und 6 Stunden lang mit 5.7n HCl totalhydrolysiert. Die DNP-Aminosäure wandert im 2dimensionalen Chromatogramm (1. Richtung Toluolsystem, 2. Richtung Phosphatpuffer pH 6.0) identisch mit DNP-Ser, während im Chromatogramm der wässrigen Phase (Phenol/Kresol/Boratpuffer pH 8.3) Alanin als einzige Aminosäure nachweisbar ist.

Quantitative Analyse der fermentativ abgespaltenen Aminosäuren:

<u>Thr</u>	<u>Ser</u>	<u>Ala</u>	<u>Val</u>	<u>Leu</u>
0.99	---	<u>1.0</u>	0.99	1.02

b) Carboxypeptidase-Einwirkung auf das restliche DNP-Peptid P₁ bei 37°C: Entnimmt man nach 30 Minuten bzw. nach 3 Stunden jeweils einen aliquoten Teil und chromatographiert man anschliessend die beiden Proben in modifiziertem PARTRIDGE-System, so wird neben dem DNP-Restpeptid, das unmittelbar hinter der Lösungsmittelfront wandert, in beiden Fällen Leucin als freie, C-terminale Aminosäure nachgewiesen.

c) 72stündige, unspezifische Salzsäurehydrolyse an 2 µMol P₁ und 2dimensionale Trennung der Partialpeptide (1. Richtung Phenol/Kresol 1:1 + 0.1% Ammoniak, 2. Richtung BEW 3:1:1). Nach dem Anfärben mit verdünntem Ninhydrin werden die Bruchstücke mit 5proz. Essigsäure vom Papier eluiert und nach 14stündiger Totalhydrolyse die einzelnen Komponenten im modifizierten PARTRIDGE-System identifiziert. (= BEW 3:1:1)

Die 8stündige Spaltung mit rauchender Salzsäure von 2 μ Mol Gesamtpeptid und die Charakterisierung der Spaltprodukte erfolgt in analoger Weise.

Das Partialpeptid Ala-Leu wird dem EDMAN-Abbau am Papier unterworfen: Anlagerung des Phenylsenföls 4 Stunden, Zyklisierung 14 Stunden, Elution der freien Aminosäure mit Wasser. Beim chromatographischen Nachweis in Phenol/Kresol/Boratpuffer (pH 8.3) wird Leucin gefunden.

15stündige Subtilisinspaltung von 3 μ Mol HT β 5:

Trennung der Partialpeptide durch 2-d-Chromatographie:

1. Richtung Phenol/0.1% Ammoniak, 2. Richtung BEW 3:1:1.

Die weitere Untersuchung der Bruchstücke entspricht dem oben angegebenen Verfahren.

Alle Hydrazinolysen werden wie bei HT α 6 ausgeführt und die C-terminalen Aminosäuren wie dort durch Chromatographie in Phenol/Kresol/Boratpuffer zugeordnet.

VI. Das Peptid HT β 4:

Gewinnung: 1. durch absteigende Papierchromatographie in BEW, $R_{Leu} = 0.14$

2. durch Elektrophorese in Pyridin-Acetatpuffer, 250 V/cm, 45 Minuten. Das Peptid wandert kathodisch. $R_{Lys} = 0.55$.

Erkennung am Papier: Ninhydrinreaktion, Histidintest.

Quantitative Analysen:

	<u>Lys</u>	<u>His</u>	<u>Asp</u>	<u>Gly</u>	<u>Ala</u>	<u>Val</u>	<u>Leu</u>
nach <u>20st.</u> Hydrolyse	1.0	1.0	0.82	1.06	<u>3.03</u>	<u>1.86</u>	0.73
" <u>40st.</u> "	1.08	0.93	1.02	1.16	<u>4.08</u>	<u>2.65</u>	1.03
" <u>80st.</u> "	1.05	0.96	1.0	1.12	<u>4.0</u>	<u>2.86</u>	0.97

Strukturermittlung:

1. Fermentative Hydrolysen

a) Nach 15stündiger Einwirkung von 100 γ Pepsin auf 1 μ Mol HT β 4 werden im PARTRIDGE-System 4 Ninhydrin-positive Banden gefunden. Sie weisen nach 20stündiger Totalhydrolyse folgende Zusammensetzung auf:

	R _{Leu}	Lys	His	Asp	Gly	Ala	Val	Leu
P ₁	0.16	1.0	1.0	---	---	1.07	---	0.95
P ₂	1.07	---	---	---	1.01	1.86	2.12	---
P ₃	0.79	---	---	+	+	+	+	---
P ₄	0.9	---	---	---	1.09	1.10	1.81	---

b) 24stündige Papainspaltung von 3 μ Mol HT β 4, eindimensionale Trennung der Partialpeptide in BEW, Elution mit 10proz. Essigsäure. Nach 20stündiger Totalhydrolyse können den Bruchstücken folgende Aminosäuren zugeordnet werden:

	R _{Leu}	Lys	His	Asp	Gly	Ala	Val	Leu
Pa ₁	0.06	+	+	-	-	+	-	-
Pa ₂	0.15	+	+	-	-	+	-	+
Pa ₃	0.85	-	-	0.89	1.11	2.72	1.61	1.0
Pa ₄	0.48	1.0	1.0	0.89	-	2.08	-	1.03
Pa ₅	1.05	-	-	-	1.01	1.8	2.15	-
Pa ₆	1.13	-	-	-	-	1	1	-

2. Die Umsetzung mit Hydrazin erfolgt bei den Partialpeptiden P₄, Pa₃ und Pa₅ jeweils 8 Stunden lang, die C-terminalen Aminosäuren werden durch Chromatographie in BEW ermittelt.

3. Sequenzanalyse am peptischen Partialpeptid P₁:

a) Nach der Totalhydrolyse von 2 μ Mol DNP-Peptid mit 12n HCl (100°C, 2 1/2 Stunden) wird DNP-Leu durch 2dimensionale Chromatographie (1. Richtung Toluolsystem, 2. Richtung Phosphatpuffer pH 6.0) identifiziert.

b) EDMAN-Abbau in Lösung: Zyklisierung 14 Stunden lang bei 37° mit HCl-gesättigtem Eisessig. Im Totalhydrolysat des Restpeptides treten Alanin und Leucin bei der quantitativen Analyse im Verhältnis 1 : 0.44 auf.

c) Partielle Säurehydrolyse von 1 μ Mol P₁ (15 1/2 Stunden, 37°C). Die Zusammensetzung des Totalhydrolysates wird papierchromatographisch im PARTRIDGE-System ermittelt:

	R _{Leu}	Leu	Ala	His	Lys
H ₁	0.07	-	+	+	+
H ₂	0.42	+	+	-	-
H ₃	0.97	+	+	+	-

4. Die N-terminale Sequenz:

a) Die 36stündige Spaltung von 2 µMol DNP-Peptid mit rauchender HCl bei 37°C führt zu 4 α-DNP-NH₂-Partialpeptiden, die sich im Toluolsystem voneinander trennen lassen. Sie werden mit 1proz. NaHCO₃-Lösung eluiert und anschliessend 20 Stunden lang in 5.7n HCl bei 110°C totalhydrolysiert. Die Komponenten werden papierchromatographisch nachgewiesen:

DNP-1:	R _f = 1.20	DNP-Val
" -2:	" 1.0	DNP-Val, Val
" -3:	" 0.73	DNP-Val, Val, Ala
" -4:	" 0.43	DNP-Val, Val, Ala, Gly

b) Der stufenweise EDMAN-Abbau am Papier wird nach FRAENKEL-CONRAT mit 4 µMol chromatographisch gewonnenem Peptid durchgeführt. Um eine eventuelle Lösung des jeweiligen Restpeptides bei der Extraktion der PTH-Aminosäure zu verhindern, verwenden wir hier - abweichend von der dort angegebenen Arbeitsweise - abs. Äther/abs. Benzol im Verhältnis 6:4.

Zyklisierung: beim	1. Schritt	6 1/2 Stunden
"	2. "	9 1/2 "
"	3.+4. "	15 "

Nach jedem Abbauschritt wird ein aliquoter Teil des Restpeptides mit 20proz. Essigsäure vom Papier eluiert und nach 40stündiger Totalhydrolyse vermessen.

Die Bestimmung der abgespaltenen PTH-Aminosäuren erfolgt chromatographisch nach SJÖQUIST, nach der 2. Stufe wird zusätzlich eine HJ-Spaltung durchgeführt und freies Valin im BEW-Chromatogramm nachgewiesen.

5. Säureamidbestimmung:

Die peptischen Bruchstücke werden in der Hochspannungselektrophorese in nur 2 Ninhydrin-positive Banden zerlegt:

a) $R_{\text{Lys}} = 0.23$ (neutral)

b) $R_{\text{Lys}} = 0.86$ (kathodisch, entspricht in der Papierchromatographie dem Partialpeptid P_1)

Die Trennung wird in Kollidin-Acetatpuffer bei 100 V/cm 45 Minuten lang ausgeführt.

Direkter Nachweis des Säureamids:

Das mit FDNB umgesetzte neutrale Gemisch wird mit Carboxypeptidase A abgebaut und nach 15stündiger Fermenteinwirkung ein Teil dieses Gemisches im STEIN- und MOORE-Apparat analysiert:

<u>Asp-NH₂</u>	<u>Gly</u>	<u>Ala</u>	<u>Val</u>
1,0	1,0	2,6	0,35

Asp-NH₂ wandert in der Austauschersäule mit derselben Geschwindigkeit wie Serin, deshalb erscheint hier ein Extinktionsgipfel, obwohl das Peptid kein Serin enthält.

VII. Das Peptid HT β 7:

Reinigung: papierchromatographisch in BEW, $R_{\text{Leu}} = 0.30$.

Erkennung am Papier: durch Ninhydrin-Reaktion und zusätzlich durch Tyrosin-Sprühtest.

Aminosäurezusammensetzung:

<u>Lys</u>	<u>Thr</u>	<u>Glu</u>	<u>Pro</u>	<u>Ala</u>	<u>Val</u>	<u>Tyr</u>	<u>Phe</u>
1,0	0,97	2,70	2,18	2,16	1,20	0,82	0,95

Sequenzanalyse:

1. 0,7 μMol des DNP-Peptides werden bei 100° 16 Stunden lang in 12n HCl totalhydrolysiert und die Endgruppe als DNP-Glu durch Chromatographie im Toluolsystem nachgewiesen. $R_f = 0.05$.

Nach 48stündiger Einwirkung von 12n HCl bei 37°C auf 2 μ Mol DNP-Peptid wird der ätherlösliche Anteil im Toluolsystem chromatographiert und nach 14stündiger Totalhydrolyse der Hauptbande (12n HCl, 100°C) die Komponenten papierchromatographisch im System BEW als DNP-Glu + Phenylalanin identifiziert.

2. Fermentative Hydrolysen:

a) 16stündige Pepsinspaltung von HT β 7:

Die Partialpeptide lassen sich sowohl chromatographisch in BEW als auch elektrophoretisch voneinander trennen. (Pyridin-Acetatpuffer, 250 V/cm, 30 Minuten).

	<u>PARTRIDGE-System</u>	<u>Elektrophorese</u>	<u>Tyrosintest</u>	
P ₁	R _{Leu} = 0.05	-	-	P ₁ wird nicht
P ₂	" 0.18	P _T : R _{Lys} = 0.57	+	untersucht, da
P ₃	" 0.63	P _B : " 0.14	-	es in zu geringer
P ₄	" 0.73	P _α : Asp 0.17	-	Menge anfällt.

Quantitative Analysen:

P₂ = P_T enthält neben Tyrosin, das bei der Totalhydrolyse teilweise zerstört wird, Ala und Glu im Verhältnis 1 : 1.45

P₃ = P_B : Das Peptid enthält nur Alanin.

P ₄ = P _{α} :	<u>Glu</u>	<u>Thr</u>	<u>Pro</u>	<u>Val</u>	<u>Phe</u>
	1.89	1.02	2.01	1.05	0.94

b) Chymotryptische Spaltung (15 ¹/₂ Stunden). Die Isolierung der Bruchstücke kann - wie bei der peptischen Hydrolyse - pherographisch oder chromatographisch erfolgen:

	PARTRIDGE-System	Elektrophorese	Tyrosintest
Chy ₁	R _{Leu} = 0.09	Chy _T R _{Lys} = 0.72	-
Chy ₂	" 0.78	Chy _{α} R _{Asp} = 0.14	+

Chy_B (R_{Lys} = 0.14) enthält Spuren an ungespaltenem Restpeptid.

Analysen:

	<u>Lys</u>	<u>Glu</u>	<u>Thr</u>	<u>Pro</u>	<u>Ala</u>	<u>Val</u>	<u>Phe</u>	<u>Tyr</u> ⁺⁾
Chy ₂ = Chy _α	-	1.77	0.8	1.96	2.0	1.1	1.07	+
Chy ₁ = Chy _γ	+	+						

⁺⁾ Tyrosin wurde unter den Bedingungen der Hydrolyse zerstört.

c) 23stündige Papainspaltung; Chromatographie der Partialpeptide in BEW, neben sehr schwach Ninhydrin-positiven Banden, die nicht weiter untersucht werden, zeigt das Partialpeptid Pa₁ nach 20stündiger Totalhydrolyse folgendes Aminosäureverhältnis:

<u>Glu</u>	<u>Thr</u>	<u>Pro</u>	<u>Val</u>	<u>Phe</u>
⁺⁾	0.9	1.95	1.13	1.08

⁺⁾ technischer Fehler bei der Messung, daher nicht auswertbar.

d) 15stündige Spaltung mit Subtilisin, Trennung der Spaltprodukte wie oben. Die 3 Hauptbanden gelangen zur Untersuchung (qualitative Analyse im BEW-System nach 20stündiger Totalhydrolyse).

	R _{Leu}	Tyr-Test	Lys	Glu	Thr	Pro	Ala	Val	Phe	Tyr
S ₁	0.07	-	+	+	-	-	-	-	-	-
S ₂	0.17	+	+	+	-	-	-	-	-	+
S ₃	0.69	-	-	+	+	+	+	+	+	-

3. Unspezifische Hydrolyse des peptischen Partialpeptides P₄:

(48 Stunden, 12n HCl, 37°C). Die Trennung der Bruchstücke geschieht in der oben beschriebenen Weise.

Nach der Totalhydrolyse (20 Stunden, 5.7n HCl, 110°) werden die Komponenten im PARTRIDGE-System zugeordnet:

	R _{Leu}	Ninhydrin-Farbe	Glu	Thr	Pro	Val	Phe
H ₁	0.96	rot-violett	+	-	-	-	+
H ₂	0.61	" "	+	-	-	+	-
H ₃	0.56	gelb	1.02	1.0	2.0	0.93	-

Der Sprühtest auf N-terminales Prolin in H_3 ist negativ. H_3 wird dem EDMAN-Abbau am Papier unterworfen (Zyklisierung 15 Stunden), und das Restpeptid nach 20stündiger Totalhydrolyse vermessen:

<u>Glu</u>	<u>Thr</u>	<u>Pro</u>	<u>Val</u>
0.99	in	2.1	0.91
Spuren			

In analoger Weise wird der EDMAN-Abbau an dem peptischen Partialpeptid P_2 durchgeführt. Im Totalhydrolysat des Restpeptides können Tyr, Glu und Lys papierchromatographisch (BEW) nachgewiesen werden, Alanin fehlt.

Die Hydrazinolyse an 3 μ Mol mit FDNB umgesetztem peptischen Partialpeptid P_4 ergibt freie Glutaminsäure. Der Nachweis erfolgt in Phenol, Kresol, Boratpuffer (pH 9.3).

Carboxypeptidase A+B spaltet am peptischen Partialpeptid P_4 in 19 Stunden Glu-NH₂ quantitativ ab. Die Identifizierung geschieht papierchromatographisch in BEW und durch Nachweis im Amino-Acid-Analyser. An dem rechromatographierten Restpeptid des Carboxypeptidase-Abbaus wird die Hydrazinolyse 10 Stunden lang durchgeführt und die freie Aminosäure im STEIN- und MOORE-Apparat als Valin zugeordnet.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Sequenzanalyse tryptischer Partialpeptide des Humanhämoglobins A.

1. Es wurden 7 Peptide aus der α - und β -Kette untersucht und die Lage von 58 Aminosäuren bestimmt:

Thr-Asp-Val-Lys

Gly-His-Gly-Lys

Met-Phe-Leu-Ser-Phe-Thr-Pro-Thr-Lys

... -Tyr-Gly-Glu-Ala-Ala-Leu-Glu-Arg

Ser-Ala-Val-Thr-Ala-Leu-Try-Gly-Lys

Val-Val-Val-Ala-Ala-Gly-Ala-Asp-Leu-Ala-His-Lys

Glu-Phe-Thr-Pro-Pro-Val-Glu-Ala-Ala-Tyr-Glu-Lys

2. Die Methoden der Eiweissanalyse und ihr weiterer Ausbau werden an diesen Beispielen diskutiert.
3. Durch diese und ähnliche Untersuchungen wird der homologe Bau der beiden Polypeptidketten des Hämoglobins deutlich.
4. Auf die mögliche Beziehung der in einem der Peptide aufgefundenen Prolyl-Doppelsequenz zu der Tertiärstruktur des Hämoglobinmoleküls wird hingewiesen.

Literaturverzeichnis

- 1) E. BRAND, J. T. EDSALL, Ann. Rev. Biochem. 16, 224 (1947)
- 2) T. SVEDBERG, R. FAHRAEUS, J. Am. Chem. Soc. 48, 430, (1926)
- 3) F. SANGER, Biochem. J. 39, 507 (1945)
- 4) H. S. RHINESMITH, W. A. SCHROEDER, L. PAULING,
J. Am. Chem. Soc. 79, 605 (1957)
- 5) H. S. RHINESMITH, W. A. SCHROEDER, L. PAULING,
J. Am. Chem. Soc. 79, 4682 (1957)
- 6) G. BRAUNITZER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 312, 72, (1958)
- 7) M. F. PERUTZ, M. G. ROSSMANN, A. F. CULLIS, H. MUIRHAED,
G. WILL, Nature 185, 416, (1960)
- 8) J. C. KENDREW, G. BODO, H. M. DINTZIS, R. G. PARRISH, H. W. WYCKOFF,
D. C. PHILLIPS, Nature 181, 662 (1958)
- 9) S. WILSON, D. B. SMITH, Canad. J. Biochem. Physiol. 37, 405 (1959)
- 10) K. HILSE, G. BRAUNITZER, Z. Naturforsch. 14b, 603, (1959)
- 11) R. J. HILL, L. C. CRAIG, J. Am. Chem. Soc. 81, 2272 (1959)
- 12) V. RUDLOFF, Diplomarbeit, München (1959)
- 13) G. BRAUNITZER, V. RUDLOFF, K. HILSE, B. LIEBOLD, R. MÜLLER,
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 320, 283, (1960)
- 14) G. BRAUNITZER, N. HILSCHMANN, K. HILSE, B. LIEBOLD,
R. MÜLLER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 322, 96, (1960)
- 15) G. BRAUNITZER, B. LIEBOLD, R. MÜLLER, V. RUDLOFF,
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 320, 170 (1960)
- 16) J. BISHOP, J. LEAHY, R. SCHWEET, Proc. A. S. 46, 1030 (1960)
- 17) H. FRAENKEL-CONRAT, J. I. HARRIS, A. L. LEVY, "Methods of Bio-
chem. Anal." II, 383, (1954)
- 18) W. A. SCHROEDER, R. SHELTON, J. Am. Chem. Soc. 82, 3342 (1960)
- 19) F. SANGER, E. THOMPSON, Bioch. J. 59, 509, (1955)
- 20) H. FRAENKEL-CONRAT, J. I. HARRIS, A. L. LEVY, "Methods of Bio-
chem. Anal." II, 360, (1954)
- 21) G. BRAUNITZER, Chem. Ber. 88, 2025 (1955)
- 22) R. J. BLOCK, E. L. DURRUM, G. ZWEIG, "Manual of Paper Chromatography
and Paper Electrophoresis", 4. Aufl. (1958)

- 23) J. SJÖQUIST, Arkiv f. Kemi, 14, 291 (1959)
- 24) G. BRAUNITZER, N. HILSCHMANN, R. MÜLLER, Hoppe-Seyler's
Z. physiol. Chem. 318, 284 (1960)
- 25) R. L. HILL, H. C. SCHWARTZ, Nature 184, 641 (1959)
- 26) J. A. HUNT, V. M. INGRAM, Nature 184, 640, 870 (1959)
- 27) G. SCHRAMM, G. BRAUNITZER, J. W. SCHNEIDER, Nature 176, 456,
(1955)
- 28) C. H. W. HIRS, S. MOORE, W. H. STEIN, J. Biol. Chem. 235, 633 (1960)
- 29) G. BRAUNITZER, G. MATSUDA, unveröffentlicht.
- 30) J. A. HUNT, Nature 183, 1373 (1959)
- 31) W. A. SCHROEDER, J. Am. Chem. Soc. 81, 4749 (1959)
- 32) W. F. WHIGT, W. A. LANDMANN, J. Am. Chem. Soc. 76, 4193 (1954)
- 33) J. I. HARRIS, Biochem. J. 71, 451 (1959)
- 34) J. I. GESCHWIND, C. H. LI, L. BARNAFI, J. Am. Chem. Soc. 79, 1003
(1957)
- 35) J. I. HARRIS, P. ROOS, Biochem. J. 71, 434 (1959)
- 36) K. HILSE, G. BRAUNITZER, Z. Naturforschung 14b, 604 (1959)
- 37) F. FEIGL, "Spot Tests in Organic Analysis", Amsterdam (1956)

Lebenslauf

Am 21. Juli 1933 wurde ich als Tochter des Forstmeisters Reinhold Müller und seiner Ehefrau Johanna, geb. Boerma, in Simmersfeld, Kreis Calw, geboren. Dort besuchte ich von 1940 an die Volksschule und kam im Januar 1944 in die Odenwaldschule. Wegen der Kriegsverhältnisse wechselte ich im Oktober 1944 an die Oberrealschule in Altensteig/Schwarzwald über. Nach der Versetzung meines Vaters nach Mochenwangen besuchte ich ab Oktober 1948 die Oberschule für Mädchen in Ravensburg, wo ich am 2. April 1952 die Reifeprüfung bestand.

Von Oktober 1952 bis März 1954 war ich Praktikantin in der Adler-Apotheke in Aulendorf und anschliessend bis März 1955 in der 7-Schwaben-Apotheke in Laupheim. Nach der pharmazeutischen Vorprüfung in Stuttgart begann ich im Sommer 1955 an der Universität Erlangen mit dem Studium. Während des Sommersemesters 1956 war ich an der Universität in Innsbruck immatrikuliert. Ich kehrte danach wieder nach Erlangen zurück und legte dort am Ende des Sommersemesters 1958 das pharmazeutische Staatsexamen ab.

Meine Doktorarbeit führte ich unter der Leitung von Herrn Professor Dr. A. Butenandt am Max-Planck-Institut für Biochemie in München aus.

